

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKÉWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 02/40668 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/12,  
C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 38/17

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12545

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Oktober 2001 (30.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 56 687.1 15. November 2000 (15.11.2000) DE  
100 59 595.2 30. November 2000 (30.11.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): APOTECH RESEARCH & DEVELOPMENT LTD. [CH/CH]; 84, Rue de Rhone, CH-1204 Genf (CH).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): TSCHOPP, Jürg [CH/CH]; 10, ch. des Fontannins, CH-1066 Epalinges (CH). MARTINON, Fabio [IT/IT]; Valentin 30, CH-1004 Lausanne (CH).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch, Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstrasse 8, 80333 München (DE).

(54) Title: PROTEINS AND DNA SEQUENCES UNDERLYING THESE PROTEINS USED FOR TREATING INFLAMMATIONS

(54) Bezeichnung: PROTEINE UND DEN PROTEINEN ZUGRUNDELIEGENDE DNA-SEQUENZEN MIT FUNKTION BEI ENTZÜNDUNGSEREIGNISSEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences, which code for at least one PYD domain, to expression vectors, which contain DNA sequences of this type, to host cells, which are transformed using expression vectors of this type, to purified gene products of said DNA sequences, to antibodies directed against said gene products, and to methods for isolating and/or expressing said gene products. The invention also relates to the use of said DNA sequences or of their gene products for treating inflammations.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren, die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind, aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen, Antikörper gegen für vorgenannten Genprodukte, sowie Verfahren zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten Genprodukte. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorgenannten DNA-Sequenzen oder von deren Genprodukten zur Behandlung von Entzündungsereignissen.

WO 02/40668 A2

**Proteine und den Proteinen zugrundeliegende DNA-Sequenzen  
mit Funktion bei Entzündungsereignissen**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für  
mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren,  
die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die  
mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind,  
aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen,  
10 Antikörper gegen die vorgenannten Genprodukte, Verfahren  
zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten  
Genprodukte und die Verwendung der DNA-Sequenzen oder der  
Genprodukte zur Behandlung von Entzündungsereignissen.
- 15 Proteine weisen einen modularen Aufbau auf, wobei die  
einzelnen Abschnitte von Proteinen strukturell und ggf.  
funktionell selbständig sind. Diese Abschnitte werden  
Domänen genannt. Proteine mit modularem Aufbau treten  
beispielsweise bei Proteinen der apoptotischen  
20 Signaltransduktionskette auf (Aravind et al. (1999) TIBS,  
24, 47-53; Hofmann (1999) Cell. Mol. Life. Sci., 55,  
1113-28). Für die Klasse der apoptotischen  
Signaltransduktionsproteine wären drei Familien von  
Domänen zu nennen, nämlich die Familie der Todesdomänen



(DD), die Familie der Todeseffektordomänen (DED) und die Familie der Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), die alle entfernt miteinander verwandt sind und auch alle einer Superfamilie angehören, die typischerweise in ihrer 3-dimensionalen Struktur ein Bündel von sechs Helices ("six helix bundle") bildet. Zu jenen Proteinen, die eine Todesdomäne, Todeseffektordomäne und/oder eine CARD-Domäne aufweisen, gehören beispielsweise die Proteine FLIP, CARDIAK-RIP2, ARC, Bcl10, DEDD, wie in den Veröffentlichungen von Irmeler et al., 1997, Nature, 388, 190-195; Koseki et al. 1998, Proct. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5156-60; McCarthy et al. 1998, J. Biol. Chem. 273, 16968-16975; Stegh, et al., 1998, EMBO J., 17, 5974-86; Thome et al., 1999, J. Biol. Chem., 274, 9962-8 gezeigt. Während also zahlreiche Proteine, die Domänen der strukturellen Superfamilie (Bündel aus sechs Helices) aufweisen, in intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse verwickelt sind, insbesondere aufgrund ihrer Fähigkeit zur Assoziierung mit vor- bzw. in der Signaltransduktion nachgeschalteten Proteinen, sind die an der Entzündungsreaktion beteiligten Proteine, ebenso wie die Form der Signalübertragung bei inflammatorischen Reaktionen weitgehend unbekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es einerseits, solche Proteine (mit ihren Aminosäuresequenzen) und ggf. den zugrundeliegenden DNA-Sequenzen zu identifizieren, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, oder aus anderem Zusammenhang bekannten Proteinen eine Funktion in der Entzündungsreaktionskaskade zuzuweisen und andererseits, durch Bestimmung der Signaltransduktionsmechanismen, Stoffe zur Behandlung inflammatorischer Reaktionen zur Verfügung zu stellen.

Zur Lösung dieser Aufgabe haben die Erfinder zunächst festgestellt, daß PYD-Domänen eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Weitergabe eines inflammatorischen Signals spielen. Erfindungsgemäß wurde

festgestellt, daß die Domäne PYD ebenfalls die Struktur des Bündels aus 6 Helices aufweist und daß sie in ihrem Interaktionspotential mit den insoweit strukturell verwandten Domänen DED, DD oder CARD vergleichbar ist.

5 Damit wird erfindungsgemäß eine vierte Familie von "Sechs-Helix-Bündel"-Domänen (hier als Domäne "PYD" bezeichnet), die als Bestandteil von nativen Proteinen auftritt, zur Verfügung gestellt.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher DNA-Sequenzen, die für ein Protein mit mindestens einer PYD-Domäne codieren, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Fragmente oder Allele. Insbesondere sind alle DNA-Sequenzen mit umfaßt, die mit den erfindungsgemäßen  
15 DNA-Sequenzen hybridisieren, einschließlich der jeweils im Doppelstrang komplementären Sequenzen (Anspruch 1).

In Hinblick auf die Hybridisierungsbedingungen wird im einzelnen offenbart, dass homologe oder sequenzverwandte DNA-Sequenzen aus allen Säugerspezies, einschließlich  
20 Mensch, nach gängigen Verfahren durch Homologie-Screening durch Hybridisierung mit einer Probe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Teilen davon isoliert werden. Unter funktionellen Äquivalenten sind auch Homologe der nativen PYD-Domänen enthaltenden  
25 Sequenzen, bspw. der in Figur 1 dargestellten Sequenzen, beispielsweise ihre Homologen aus anderen Mammalia, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nicht-codierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

30 Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche, die auf dem Fachmann bekannte Weise ermittelt werden können, verwendet. In jedem Fall wird die Verwendung und Funktion von mindestens 15, vorzugsweise mindestens 20 AS langen Nukleotidabschnitten  
35 (auch als solche offenbart) der in Figur enthaltenen Nukleotidsequenzen als Primer für PCR-Reaktionen oder als

Oligonukleotide auf DNA-Chips offenbart. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure-Sequenz (Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz) bzw. je nachdem, welche Nukleinsäureart (DNA oder RNA) für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge. Unter Standardbedingungen sind beispielsweise, je nach Nukleinsäure, Temperaturen zwischen 42 und 58 °C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid, wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC, 50% Formamid, zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise bei Sambrook et al. ("Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln, beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausübel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John

Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden solche erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen offenbart, für die sich ein Signifikanzniveau von  $p < 10^{-2}$  ergibt, wenn die PYD-Domäne einer Ziel-DNA-Sequenz (also einer potentiell erfindungsgemäßen DNA-Sequenz) mit einem Suchprofil nach Figur 3 verglichen wird (Anspruch 2). In Hinblick auf die diesbezügliche experimentelle Vorgehensweise wird auf die Veröffentlichung von Bucher et al. (1996, Computer Chem., 20, 3-24) und auf die entsprechenden Erläuterungen in der offengelegten deutschen Patentanmeldung DE 197 13 393.2-41 verwiesen, die beide insoweit Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden DNA-Sequenzen offenbart, deren Genprodukt eine der Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), wie in Figur 6 wiedergegeben, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Allele oder Fragmente, enthält. Vorteilhafterweise weisen derartige Derivate oder Allele eine Sequenzhomologie von mindestens 80%, vorzugsweise von mindestens 90% und noch stärker bevorzugt von mindestens 95% und am stärksten bevorzugt von mindestens 98% mit der vorgenannten Sequenz auf. Auch mit diesen erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisierende DNA-Sequenzen (einschließlich der Sequenzen des komplementären DNA-Stranges) sind mitoffenbart (Anspruch 3).

Bevorzugt sind weiterhin DNA-Sequenzen, die eine der in Figur 1 angegebenen (c) DNA-Sequenzen enthalten (Anspruch

4). Im Zuge der erfindungsgemäßen Feststellungen wurde nämlich herausgefunden, daß erfindungsgemäße DNA-Sequenzen für zahlreiche Proteine (Aminosäuresequenzen) mit einer PYD-Domäne codieren, die insbesondere auch am ggf. pathophysiologischen Inflammationsgeschehen beteiligt sind. Diese DNA-Sequenzen (einschließlich der entsprechenden Aminosäuresequenzen) sind in Fig. 1 dargestellt. Hierzu gehören, wie in Figur 1 jeweils mit Codierungsnummer dargestellt, die Proteine Pyrin (siehe entsprechende Protein- bzw. cDNA-Sequenzen gemäß Fig. 1, Codierungsnummer 1.2), Pycard (Protein und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.3), Pyc (Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.1), NALP1 (Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.4), NALP2 ((alter Name Py7) mit Protein- und einer DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.5), NALP3 ((alter Name PY5) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.6), NALP4 ((alter Name PY6) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.7), NALP5 ((alter Name Py8) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.8), NALP6 ((alter Name PY9) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.9), PY10 (mit Protein- und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.10), NALP7 ((alter Name Py11) mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.11), NALP8 ((alter Name Py12) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.12), NALP9 ((alter Name Py13) mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.13), NALP10 ((alter Name Py14) mit Protein- und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.14), NALP11 ((alter Name Py15) mit Protein- und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.15), Py16 ((von der Maus), mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.16), NALP13 ((alter Name Py17), mit Protein- und CDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.17), NALP14 ((alter Name Py18), von der Maus, mit Protein- und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.18), NALP15 ((alter Name Py19) mit Protein- und partieller DNA-

Sequenz, Codierungsnummer 1.19), NALP12 ((alter Name Py20), von der Maus, mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.20). Die vorgenannten Sequenzen sind sämtlich in Figur 1 aufgetragen und dort unter den  
5 vorgenannten Bezeichnungen bzw. den Codierungsnummern auffindbar. Die zusammengehörigen, d. h. unter einer Codierungsnummer zusammengefaßten DNA- und Proteinsequenzen sind jeweils durch gepunktete Linien im Fettdruck von der nächsten Einheit getrennt. Figur 1  
10 umfaßt 22 durchnummerierte Seiten. Damit handelt es sich bei einem weiteren bevorzugten Gegenstand der vorliegenden Erfindung um DNA-Sequenzen, die für eines der in Figur 1 dargestellten Genprodukte (d.h. für eine der in Figur 1 enthaltenen Aminosäuresequenzen) codieren  
15 oder DNA-Sequenzen, die zumindest in einem Abschnitt der Gesamtsequenz für eine der in Figur 1 angegebenen Aminosäuresequenzen codieren (Anspruch 5).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind  
20 Expressionsvektoren, die eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, bspw. wie zuvor offenbart oder gemäß Ansprüchen 1 bis 5 beansprucht, enthalten (Anspruch 6). Derartige erfindungsgemäße Expressionsvektoren (bspw. Plasmide) enthalten neben mindestens einer erfindungsgemäßen DNA-  
25 Sequenz typischerweise auch Promotor-Bereiche und Terminator-Bereiche, ggf. auch Marker-Gene (bspw. Antibiotika-Resistenz-Gene) und/oder Signalsequenzen zum Transport des translatierten Proteins.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformiert wurden (Anspruch 7). Als geeignete Wirtszellen zur Klonierung oder Exprimierung der  
erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen kommen Prokaryotenhefen  
35 oder höhere eukaryotische Zellen in Frage. Bei Prokaryoten sind Gram-negative oder Gram-positive Organismen

ausdrücklich eingeschlossen. Zu nennen ist hier E.coli oder Bazillen. Als bevorzugte Wirtszellen zur Klonierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen werden die Stämme E.coli 294, E.coli B und E.coli X1776 sowie E.coli W3110  
5 offenbart. Bei den Bazillen stehen Bazillus subtilis, Salmonella typhimurium oder ähnliche. Wie oben bereits erwähnt, enthalten die Expressionsvektoren typischerweise eine Signalsequenz zum Transport des Proteins in das Kulturmedium, so werden prokaryotische Zellen eingesetzt  
10 werden. Neben Prokaryoten kommen auch eukaryotische Mikroben als Wirtszellen, die mit dem Expressionsvektor transfiziert worden sind, in Frage. So etwa können filamentöse Pilze oder Hefen als geeignete Wirtszellen für die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codierende Vektoren  
15 eingesetzt werden. Zu nennen ist vor allem Saccharomycis cerevisiae oder die gewöhnliche Bäckerhefe (Stinchcomb et al., Nature, 282:39, (1997)).

In einer bevorzugten Ausführungsform werden jedoch zur  
20 Expression von erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen Zellen aus multizellulären Organismen gewählt. Dies geschieht auch vor dem Hintergrund einer möglicherweise erforderlichen Glykosilierung der codierten Proteine. Diese Funktion kann in höheren Eukaryotenzellen - im Vergleich zu  
25 Prokaryotenzellen - in geeigneter Weise ausgeführt werden. Im Prinzip ist jede höhere eukaryotische Zellkultur als Wirtszelle verfügbar, wenn auch Zellen von Säugern, beispielsweise Affen, Ratten, Hamstern oder Menschen, ganz besonders bevorzugt sind. Dem Fachmann ist eine Vielzahl  
30 von etablierten Zelllinien bekannt. In einer keineswegs abschließenden Aufzählung werden die folgenden Zelllinien genannt: 293T (Embryonennierenzelllinie), (Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1997)), BHK (Babyhamsternierenzellen), CHO (Zellen aus den  
35 Hamsterovarien), (Urlaub und Chasin, P. N. A. S. (USA)

77:4216, (1980)), HeLa (humane Cervixkarzinomzellen) und weitere Zelllinien.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind mit Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen aufweisen, vorzugsweise Zellen des Säugetierimmunsystems, vor allem des humanen Immunsystems, transfiziert (Anspruch 8).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sind die Genprodukte der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen (Anspruch 9). Unter Genprodukten versteht man im Sinne dieser Erfindung sowohl Primärtranskripte, also RNA, vorzugsweise mRNA, als auch Proteine bzw. Polypeptide, insbesondere in aufgereinigter Form (Anspruch 10). Diese Proteine weisen erfindungsgemäß mindestens eine PYD-Domäne auf und regulieren oder transportieren insbesondere inflammatorische Signale. Bevorzugt ist ein aufgereinigtes Genprodukt dann, wenn es eine der in Figur 7 angegebenen Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), einschließlich aller funktionshomologen Allele, Fragmente oder Derivate enthält. Zu den erfindungsgemäßen Proteinen gehören aber auch all jene Proteine, die sich von erfindungsgemäßen DNA-Derivaten, DNA-Fragmenten oder DNA-Allelen ableiten.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Proteine chemisch modifiziert sein. So etwa kann eine Schutzgruppe am N-Terminus vorliegen. Es können Glykosylgruppen an Hydroxyl- oder Aminogruppen angefügt sein, Lipide (insbesondere Fettsäuren, bspw. Myristyl- oder Palmitylsäure) können kovalent mit dem erfindungsgemäßen Protein verbunden sein, ebenso Phosphate oder Acetylgruppen und ähnliches. Auch beliebige chemische Substanzen, Verbindungen oder Gruppen können auf einem beliebigen Syntheseweg an das erfindungsgemäße Protein gebunden sein. Auch zusätzliche Aminosäuren, z.B. in Form einzelner Aminosäuren oder in Form von Peptiden oder in



Form von Proteindomänen und ähnliches, können mit dem N- und/oder C-Terminus fusioniert sein. Insbesondere sind hier sogenannte Signal- oder "Leader"-Sequenzen am N-Terminus der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz vorliegen, die das Peptid cotranslational oder posttranslational in eine bestimmte Zellorganelle oder in den extrazellulären Raum (bzw. das Kulturmedium) führen. Am N- oder am C-Terminus können auch Aminosäuresequenzen vorliegen, die als Antigen die Bindung der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz an Antikörper erlauben. Zu nennen ist hier insbesondere das Flag-Peptid, dessen Sequenz im Einbuchstabencode der Aminosäuren lautet: DYKDDDDK oder auch His-Tags (mindestens 5, vorzugsweise mindestens 6 His-Reste). Diese Sequenz hat stark antigene Eigenschaften und erlaubt somit eine schnelle Überprüfung und leichte Reinigung des rekombinanten Proteins. Monoklonale Antikörper, die das Flag-Peptid binden, sind von der Firma Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut erhältlich. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in zahlreichen Exons, die durch Introns voneinander getrennt sind, auf dem Strang des Erbinformationsmoleküls abgelegt sein. Damit gehören auch alle denkbaren SPLICE-Varianten (auf mRNA-Ebene) als Genprodukte zum erfindungsgemäßen Gegenstand. Auch die von diesen verschiedenen SPLICE-Varianten codierten Proteine unterfallen dieser Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper, der ein Epitop auf einem erfindungsgemäßen Genprodukt, insbesondere einem erfindungsgemäßen Protein, erkennt (Anspruch 12). Der Begriff "Antikörper" umfaßt i.S. der vorliegenden Erfindung sowohl polyklonale Antikörper als auch monoklonale Antikörper (Anspruch 13), chimärische Antikörper, anti-idiotypische Antikörper (gerichtet gegen

erfindungsgemäße Antikörper), die alle in gebundener oder löslicher Form vorliegen und ggf. durch "Label" markiert sein können, sowie auch Fragmente der vorgenannten Antikörper. Neben den Fragmenten von erfindungsgemäßen Antikörpern in Alleinstellung können erfindungsgemäße Antikörper auch in rekombinanter Form als Fusionsproteine mit anderen (Protein)-Bestandteilen auftreten. Fragmente als solche oder Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern als Bestandteile von Fusionsproteinen werden typischerweise durch die Methoden enzymatischer Spaltung, der Protein-Synthese oder die dem Fachmann geläufigen Rekombinationsmethoden hergestellt.

Bei den polyklonalen Antikörpern handelt es sich um heterogene Mischungen von Antikörpermolekülen, die aus Seren von Tieren hergestellt werden, die mit einem Antigen immunisiert worden sind. Ein monoklonaler Antikörper enthält eine im wesentlichen homogene Population von Antikörpern, die spezifisch gegen Antigene gerichtet sind, wobei die Antikörper im wesentlichen gleiche Epitop-Bindungsstellen aufweisen. Monoklonale Antikörper können durch die im Stand der Technik bekannten Verfahren erhalten werden (z. B. Köhler und Milstein, Nature, 256, 495-397, (1975); US-Patent 4,376,110; Ausübel et al., Harlow und Lane "Antikörper": Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory (1988)). Die in den vorgenannten Literaturstellen enthaltene Beschreibung wird als Bestandteil der vorliegenden Erfindung in die Offenbarung der vorliegenden Erfindung einbezogen. Erfindungsgemäße Antikörper können einer der folgenden Immunglobulinklassen angehören: IgG, IgM, IgE, IgA, GILD und ggf. einer Unterklasse der vorgenannten Klassen. Ein Hybridom-Zellklon, der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper produziert, kann in vitro, in situ oder in vivo kultiviert werden. Die Herstellung von großen Titern an monoklonalen Antikörpern erfolgt vorzugsweise in vivo oder in situ.

Bei den erfindungsgemäßen chimärische Antikörpern handelt es sich um Moleküle, die verschiedene Bestandteile enthalten, wobei diese sich aus verschiedenen Tierarten ableiten (z. B. Antikörper, die eine variable Region, die aus einem Mäuse-monoklonalen Antikörper abgeleitet ist, und eine konstante Region eines humanen Immunglobulin aufweisen). Chimärische Antikörper werden vorzugsweise eingesetzt, um einerseits die Immunogenizität bei der Anwendung zu reduzieren und andererseits die Ausbeuten bei der Produktion zu erhöhen, z.B. ergeben murine monoklonale Antikörper höhere Ausbeuten aus Hybridom-Zelllinien, führen aber auch zu einer höheren Immunogenizität beim Menschen, so daß human/murine chimärische Antikörper vorzugsweise eingesetzt werden. Chimärische Antikörper und Verfahren zu ihrer Herstellung sind aus dem Stand der Technik bekannt (Cabilly et al., Proc. Natl. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al. Nature 312 643-646 (1984); Cabilly et al., EP-A-125023; Neuberger et al., Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., EP-A-171496; Morrison et al., EP-A-173494; Neuberger et al., WO 86/01533; Kudo et al., EP-A-184187; Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., WO 87/02671; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:214218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) und Harlow und Lane, Antikörper: A Laboratory Manual, wie oben zitiert. Diese Zitatstellen werden als zur Offenbarung gehörig in die vorliegende Erfindung einbezogen.

Ganz besonders bevorzugt wird ein solcher erfindungsgemäßer Antikörper gegen einen Sequenzabschnitt auf der PYD-Domäne als Epitop gerichtet sein (Anspruch 14).

Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper ist ein Antikörper, der eine Determinante, die im allgemeinen

mit der Antigenbindungsstelle eines erfindungsgemäßen Antikörpers assoziiert ist, erkennt. Ein anti-idiotypischer Antikörper kann durch die Immunisierung eines Tieres der gleichen Art und des gleichen genetischen Typs (z.B. eines Mäusestamms) als Ausgangspunkt für einen monoklonalen Antikörper, gegen welchen ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper gerichtet ist, hergestellt werden. Das immunisierte Tier wird die idiotypischen Determinanten des immunisierenden Antikörpers durch die Produktion eines Antikörpers, der gegen die idiotypischen Determinanten gerichtet ist (nämlich ein erfindungsgemäßer anti-idiotischer Antikörper), erkennen (U.S. 4,699,880). Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper kann auch als Immunogen eingesetzt werden, um eine Immunantwort in einem weiteren Tier hervorzurufen und um dort zur Produktion eines sog. anti-anti-idiotypischen Antikörpers zu führen. Der anti-anti-idiotypische Antikörper kann, muß aber nicht, bezüglich seiner Epitop-Konstruktion identisch mit dem originären monoklonalen Antikörper sein, der die anti-idiotypische Reaktion hervorgerufen hat. Auf diese Weise können durch die Verwendung von gegen idiotypische Determinanten eines monoklonalen Antikörpers gerichtete Antikörper andere Klone, die Antikörper von identischer Spezifität exprimieren, identifiziert werden.

Monoklonale Antikörper, die gegen erfindungsgemäße Proteine, Analoge, Fragmente oder Derivate dieser erfindungsgemäßen Proteine gerichtet sind, können eingesetzt werden, um die Bindung von anti-idiotypischen Antikörpern in entsprechenden Tieren, wie z. B. der BALB/c Maus, zu induzieren. Zellen aus der Milz einer solchen immunisierten Maus können verwendet werden, um anti-idiotypische Hybridom-Zelllinien, die anti-idiotypische monoklonale Antikörper sekretieren, zu produzieren. Weiterhin können anti-idiotypische monoklonale Antikörper auch an einen Träger gekoppelt

werden (KLH, "keyhole limpet hemocyanin") und dann verwendet werden, um weitere BALB/c-Mäuse zu immunisieren. Die Sera dieser Mäuse enthalten dann anti-anti-idiotypische Antikörper, die die Bindungseigenschaften der originären monoklonalen Antikörper haben und spezifisch für ein Epitop des erfindungsgemäßen Proteins oder eines Fragments oder Derivats von demselben sind. Die anti-idiotypischen monoklonalen Antikörper haben auf diese Weise ihre eigenen idiotypischen Epitope oder "Idiotope", die strukturell mit dem zu untersuchenden Epitop ähnlich sind.

Die Bezeichnung "Antikörper" soll sowohl intakte Moleküle als auch Fragmente derselben einschließen, z.B. Fab und  $F(ab')_2$ . Fab und  $F(ab')_2$ -Fragmente entbehren eines Fc-Fragments, wie etwa in einem intakten Antikörper vorhanden, so daß sie im Blutkreislauf schneller transportiert werden können und vergleichsweise weniger nicht-spezifische Gewebsbindung als intakte Antikörper aufweisen. Hierbei wird hervorgehoben, daß Fab und  $F(ab')_2$  Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern bei der Detektion und Quantifizierung von erfindungsgemäßen Proteinen eingesetzt werden können. Solche Fragmente werden typischerweise durch proteolytische Spaltung hergestellt, indem Enzyme, wie z. B. Papain (zur Herstellung von Fab-Fragmenten) oder Pepsin (zur Herstellung von  $F(ab')_2$  Fragmenten) verwendet werden.

Erfindungsgemäße Antikörper, einschließlich der Fragmente von diesen Antikörpern, können zur quantitativen oder qualitativen Detektion von erfindungsgemäßigem Protein in einer Probe eingesetzt werden oder auch zur Detektion von Zellen, die erfindungsgemäße Proteine exprimieren und ggf. sekretieren. Die Detektion kann mit Hilfe von Immunofluoreszenz-Verfahren erreicht werden, die Fluoreszenz-markierte Antikörper in Kombination mit

Lichtmikroskopie, Flußzytometrie oder fluorometrischer Detektion durchgeführt werden.

Erfindungsgemäße Antikörper (oder Fragmente dieser Antikörper) eignen sich für histologische Untersuchungen, wie z.B. im Rahmen der Immunofluoreszenz oder Immunoелеktromikroskopie, für die in situ Detektion eines erfindungsgemäßen Proteins. Die in situ Detektion kann dadurch erfolgen, daß eine histologische Probe von einem Patienten genommen wird und markierte erfindungsgemäße Antikörper zu einer solchen Probe hinzugegeben werden. Der Antikörper (oder ein Fragment dieses Antikörpers) wird in markierter Form auf die biologische Probe aufgetragen. Auf diese Weise ist es nicht nur möglich, die Anwesenheit von erfindungsgemäßigem Protein in der Probe zu bestimmen, sondern auch die Verteilung des erfindungsgemäßen Proteins in dem untersuchten Gewebe. Bei der biologischen Probe kann es sich um eine biologische Flüssigkeit, ein Gewebeextrakt, geerntete Zellen, wie z. B. Immunzellen oder Herzmuskel- oder Leberzellen, oder allgemein um Zellen, die in einer Gewebekultur inkubiert worden sind, handeln. Die Detektion des markierten Antikörpers kann je nach Art der Markierung durch im Stand der Technik bekannte Verfahren (z. B. durch Fluoreszenzverfahren) erfolgen. Die biologische Probe kann aber auch auf einem Festphasenträger, wie z. B. Nitrocellulose oder ein anderes Trägermaterial, aufgetragen werden, so daß die Zellen, Zellteile oder löslichen Proteine immobilisiert werden. Der Träger kann dann mit einem geeigneten Puffer ein- oder mehrfach gewaschen werden, wobei nachfolgend mit einem detektierbar markierten Antikörper nach der vorliegenden Erfindung behandelt wird. Der Festphasenträger kann dann mit dem Puffer ein zweites Mal gewaschen werden, um nicht-gebundenen Antikörper zu beseitigen. Die Menge an gebundener Markierung auf dem Festphasenträger kann dann mit einem herkömmlichen Verfahren bestimmt werden.

Als Träger eignen sich insbesondere Glas, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon-Amylasen, natürliche oder modifizierte Zellulosen, Polyacrylamide und Magnetit. Der Träger kann entweder bedingt löslichen oder unlöslichen Charakters sein, um die Bedingungen nach Maßgabe der vorliegenden Erfindung zu erfüllen. Das Trägermaterial kann beliebige Formen einnehmen, z. B. in Form von Kügelchen ("beads"), oder zylindrisch oder sphärisch sein, wobei Polystyrol-Kügelchen als Träger bevorzugt sind.

Eine detektierbare Antikörpermarkierung kann auf verschiedene Weise erfolgen. Beispielsweise kann der Antikörper an ein Enzym gebunden werden, wobei das Enzym schließlich in einem Immunoassay (EIA) eingesetzt werden kann. Das Enzym kann dann später mit einem entsprechenden Substrat reagieren, so daß eine chemische Verbindung entsteht, die auf eine dem Fachmann geläufige Art und Weise detektiert und ggf. quantifiziert werden kann, z. B. durch Spektrophotometrie, Fluorometrie oder andere optische Verfahren. Bei dem Enzym kann es sich um Malat-Dehydrogenase, Staphylokokken-Nuklease, delta-5-Steroid Isomerase, Hefe-alkohol-Dehydrogenase, alpha-Glycerophosphat-dehydrogenase, Triosephosphatisomerase, Meerrettich-Peroxidase, alkalische Phosphatase, Aspariginase, Glucoseoxidase, beta-Galactosidase, Ribonuklease, Urease, Katalase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glucoamylase oder Acetylcholinesterase handeln. Die Detektion wird dann über ein chromogenes Substrat, das spezifisch für das für die Markierung eingesetzte Enzym ist, ermöglicht und kann schließlich z.B. über Sichtvergleich des durch die Enzymreaktion umgesetzten Substrats im Vergleich zu Kontrollstandards erfolgen.

Weiterhin kann die Detektion durch andere Immunoassays sichergestellt werden, z.B. durch radioaktive Markierung der Antikörper oder Antikörperfragmente (also durch einen

Radioimmunoassay (RIA; Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Work, T. et al. North Holland Publishing Company, New York (1978). Das radioaktive Isotop kann dabei durch die Verwendung von Szintillationszählern oder durch Autoradiographie detektiert und quantifiziert werden.

Fluoreszierende Verbindungen können gleichfalls zur Markierung eingesetzt werden, beispielsweise Verbindungen wie Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phthaldehyd und Fluorescamin. Auch fluoreszenzemittierende Metalle, wie z. B.  $^{152}\text{E}$  oder andere Metalle aus der Lanthanid-Gruppe, können eingesetzt werden. Diese Metalle werden an den Antikörper über Chelatgruppen, wie z. B. Diethylentriaminpentaessigsäure (ETPA) oder EDTA angekoppelt. Weiterhin kann der erfindungsgemäße Antikörper über eine mit Hilfe von Chemilumineszenz wirkende Verbindung angekoppelt werden. Die Gegenwart des Chemilumineszenz-markierten Antikörpers wird dann über die Lumineszenz, die im Verlauf einer chemischen Reaktion entsteht, detektiert. Beispiele für derartige Verbindungen sind Luminol, Isoluminol, Acridiniumester, Imidazol, Acridiniumsalz oder Oxalatester. Gleichmaßen können auch biolumineszente Verbindungen zum Einsatz kommen. Biolumineszenz ist eine Unterart der Chemilumineszenz, die bei biologischen Systemen vorgefunden wird, wobei ein katalytisches Protein die Effizienz der chemilumineszenten Reaktion verstärkt. Die Detektion des biolumineszenten Proteins erfolgt wiederum über die Lumineszenz, wobei als biolumineszente Verbindung beispielsweise Luciferin, Luciferase oder Aequorin in Betracht kommen.

Ein erfindungsgemäßer Antikörper kann für die Verwendung in einem immunometrischen Assay, auch bekannt als "two-site" oder "sandwich" Assay, zur Anwendung gelangen. Typische immunometrische Assay-Systeme schließen sog.



"Vorwärts"-Assays ein, die sich dadurch auszeichnen, daß erfindungsgemäße Antikörper an ein Festphasensystem gebunden sind und daß der Antikörper mit der Probe, die untersucht wird, auf diese Weise in Kontakt gebracht wird. Derart wird das Antigen aus der Probe durch die Bildung eines binären Festphasen-Antikörper-Antigen-Komplexes aus der Probe isoliert. Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird der feste Träger gewaschen, um den verbleibenden Rest der flüssigen Probe zu beseitigen, einschließlich des ggf. nicht gebundenen Antigens, und daraufhin mit einer Lösung in Kontakt gebracht, die eine unbekannte Menge an markiertem Detektionsantikörper enthält. Der markierte Antikörper dient hierbei als sog. Reporter-Molekül. Nach einer zweiten Inkubationszeit, die es den markierten Antikörper erlaubt, mit dem an die Festphase gebundenen Antigen zu assoziieren, wird der Festphasenträger erneut gewaschen, um markierte Antikörper, die nicht reagiert haben, zu beseitigen.

In einer alternativen Assay-Form kann auch ein sog. "sandwich"-Assay zum Einsatz kommen. Hierbei kann ein einziger Inkubationsschritt ausreichen, wenn der an die Festphase gebundene Antikörper und der markierte Antikörper beide gleichzeitig auf die zu testende Probe aufgebracht werden. Nach Abschluß der Inkubation wird der Festphasenträger gewaschen, um Rückstände der flüssigen Probe und der nicht-assoziierten markierten Antikörper zu beseitigen. Die Anwesenheit von markiertem Antikörper auf dem Festphasenträger wird genau so bestimmt, wie bei den konventionellen "Vorwärts"-Sandwich-Assay. Bei dem sog. reversen Assay wird schrittweise zunächst eine Lösung des markierten Antikörpers zur Flüssigprobe hinzugefügt, gefolgt von der Beimischung von nicht-markiertem Antikörper, gebunden an einen Festphasenträger, nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit. Nach einem zweiten Inkubationsschritt wird der Festphasenträger in herkömmlicher Weise gewaschen, um ihn von Probenüberresten und von markiertem Antikörper, der nicht

reagiert hat, zu befreien. Die Bestimmung des markierten Antikörpers, der mit dem Festphasenträger reagiert hat, wird dann, so wie oben beschrieben, durchgeführt.

5 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, wobei die Wirtszellen mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformiert und dann unter geeigneten, die Expression fördernden Bedingungen  
10 kultiviert werden, so daß das Genprodukt schließlich aus der Kultur aufgereinigt werden kann (Anspruch 15). Das Protein der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz kann dabei, abhängig von dem Expressionssystem, aus einem Kulturmedium oder aus Zellextrakten isoliert werden. Der Fachmann kann  
15 ohne weiteres erkennen, daß die jeweiligen Isolierungsmethoden und das Verfahren bei der Aufreinigung des von einer erfindungsgemäßen DNA codierten, rekombinanten Proteins stark vom Typ der Wirtszelle oder auch von dem Umstand, ob das Protein in das Medium  
20 sekretiert wird, abhängt. Zum Beispiel können Expressionssysteme eingesetzt werden, die zur Sekretion des rekombinanten Proteins führen. Das Kulturmedium muß in diesem Fall durch kommerziell erhältliche Proteinkonzentrationsfilter, z.B. Amicon oder Millipore  
25 Pelicon, aufkonzentriert werden. Nach dem Konzentrationsschritt kann ein Reinigungsschritt erfolgen, z.B. ein Gelfiltrationsschritt. Alternativ kann aber auch ein Anionenaustauscher eingesetzt werden, der eine Matrix mit DEAE aufweist.

30

Als Matrix dienen dabei alle aus der Proteinreinigung bekannten Materialien, z.B. Acrylamid oder Agarose oder Dextran oder ähnliches. Es kann aber auch ein Kationenaustauscher eingesetzt werden, der dann typischerweise  
35 Carboxymethyl-Gruppen enthält. Zur weiteren Reinigung eines durch eine erfindungsgemäße DNA codierten Proteins

können dann HPLC-Schritte dienen. Es kann sich um einen oder mehrere Schritte handeln. Insbesondere wird die "Reversed-Phase"-Methode eingesetzt. Diese Schritte dienen zum Erhalt eines im wesentlichen homogenen rekombinanten Proteins einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz.

Neben bakteriellen Zellkulturen zur Isolierung des Genprodukts können auch transformierte Hefezellen eingesetzt werden. In diesem Fall kann das translatierte Protein sekretiert werden, so daß die Proteinreinigung vereinfacht wird. Sekretiertes rekombinantes Protein aus einer Hefewirtszelle kann durch Methoden erhalten werden, wie sie bei Urdal et al. (J. Chromato. 296:171 (1994)) offenbart sind.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Expression von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, wobei Wirtszellen mit einem Expressionsvektor, der eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz enthält, transformiert werden (Anspruch 17). Dieses Verfahren zur Expression von Genprodukten, die auf einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz beruhen, dient nicht dazu, das entsprechende Genprodukt zu konzentrieren und aufzureinigen, sondern vielmehr dazu, den Zellstoffwechsel durch das Einführen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen über die Expression des dazugehörigen Genprodukts zu beeinflussen. Hier ist insbesondere an die Verwendung der mit Hilfe von Expressionsvektoren transformierten Wirtszellen zum Zwecke der Ausschaltung der inflammatorischen Reaktion zu denken. Durch die Verwendung eines sogenannten konstitutiven Promotors können in diesen Zellen gleichbleibende Konzentrationen von auf erfindungsgemäßen Sequenzen beruhenden Proteinen exprimiert werden. Auf diese Weise wird dauerhaft die Auslösung der Inflammation unterbunden.

Die entsprechenden Zelllinien werden dadurch gegenüber einer Vielzahl von inflammatorischen Stimulanzen resistent. Diese modifizierten Zellen können auch  
5 gegebenenfalls wieder in den Säuger- oder humanen Organismus rücküberführt werden. Auf diese Weise wird durch in vitro mit den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren manipulierter Zellen und die anschließende Übertragung (Transplantation) in den  
10 Organismus ein gentherapeutischer Einsatz der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen möglich. Dabei werden Expressionsvektoren mit den erfindungsgemäßen Sequenzen vorzugsweise in solche Zellen transfiziert, die im Organismus einer Fehlsteuerung der Inflammation  
15 anheimfallen (bspw. Hepatocyten bei chronischer Leberentzündung). Insbesondere werden in einem solchen gentherapeutischen Ansatz erfindungsgemäße Sequenzen eingesetzt, die das inflammatorische Signal blockieren, bspw. Fragmente, die das inflammatorische Signal nicht  
20 weitertragen und damit die Signaltransduktion unterbrechen.

Mit dem vorliegenden Erfindungsgedanken geht aber auch ein gentherapeutisches Verfahren, das in vivo durchgeführt  
25 werden kann, einher. Zu diesem Zwecke werden Vektoren eingesetzt (z.B. Liposomen, Adenoviren, Retroviren oder ähnliche oder auch nackte DNA), die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen gezielt in die gewünschten Zielzellen des Organismus insertieren. Bei den Zielzellen handelt es sich  
30 typischerweise um Zellen, deren Inflamationsregulation gestört ist, insbesondere um Zellen, die pathologisch eine verstärkte Disposition zur Entzündungsreaktion zeigen (bspw. bei chronischer Leberentzündung). In diesem Zusammenhang können Fragmente einer erfindungsgemäßen DNA-  
35 Sequenz zum Einsatz kommen, die inhibitorische Wirkung entfalten, bspw. DNA-Sequenzen, die im wesentlichen nur

die PYD-Domäne enthalten und damit nur noch eine Assziierungsfunktion wahrnehmen können, nicht aber weitergehend biologische Signale (zur Inflammation) weitergeben können - also keine weitere biologische Funktionalität aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz (Allele, Derivate, Fragmente) oder eines erfindungsgemäßen Genprodukts zur Behandlung von Erkrankungen, die auf fehlgesteuerter intrazellulärer Signaltransduktion beruhen (Anspruch 17). Die vorgenannte erfindungsgemäße Verwendung von DNA-Sequenzen schließt auch die Verwendung von oben beschriebenen erfindungsgemäßen Expressionsvektoren ein, die eine erfindungsgemäße Nukleotidsequenz, bspw. eine in Fig. 1 offenbarte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles Derivat oder Allel einer solchen Sequenz (oder auch ein infunktionelles Derivat einer solchen Sequenz) aufweisen, mit dem Ziel, die fehlgeleitete intrazelluläre Signaltransduktion zu korrigieren. Die Verwendung kann nach gentherapeutischen Verfahren über Injektion von nackter erfindungsgemäßer DNA oder dem Protein oder über Genfähren, insbesondere virale oder liposomale Vektoren, erfolgen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher sowohl die Verwendung derartiger erfindungsgemäßer Expressionsvektoren sowie die erfindungsgemäße Verwendung von Zellen (d.h. die Verwendung zur Auslösung (oder zur Blockade) des Inflammationsgeschehens), die mit erfindungsgemäßen Expressionsvektoren transfiziert sind.

Im einzelnen läßt sich feststellen, daß derartige Gentherapieansätze sich bereits als wirksam bei der Therapie von genetisch bedingten Erkrankung, beispielsweise bei der Bluterkrankheit, und auch bei der Behandlung anderer genetischer Erkrankung, wie

beispielsweise cystischer Fibrose, sich als wirksam erwiesen haben. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Nukleotidsequenz erfindungsgemäßer Art, beispielsweise eine Nukleotidsequenz gemäß den in Figur 1

5 enthaltenen Nukleotidsequenzen oder eine Variante (Derivat, Fragment (vor allem mindestens 100 Basen umfassen, oder Allel) dieser Sequenz in einen geeigneten Vektor überführt, der die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz in die Säugetierzellen, vorzugsweise

10 Humanzellen, einschleust. Besonders geeignete Transfektionsvektoren für diese Anwendung sind Retroviren und Adenoviren. Alternativ können auch erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen in einem molekularen Konjugat mit einem Virus (beispielsweise einem Adenovirus) oder mit

15 viralen Komponenten (beispielsweise Capsidproteinen) komplexiert sein. Geeignete Methoden für die Bildung derartiger Vektoren sind im Stand der Technik wohl bekannt, wobei beispielsweise auf die Offenbarung in "Working toward Human Genetherapy", Kapitel 28 ( in

20 Recombinant DNA, Second Edition, Watson GD et al, New York: Scientific American Books, S. 567 - 581, 1992) verwiesen wird. Bei einem derartigen gentherapeutischen Verfahren werden mit erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen transfizierte Vektoren in Zellen oder Geweben

25 vorzugsweise durch Injektion, Inhalation, orale Einnahme oder Aufnahme durch Schleimhäute dem betroffenen Patienten verabreicht. Ein derartiger Versuchsansatz wird im allgemeinen als in-vitro-Gentherapie bezeichnet. Alternativ können Zellen oder Gewebe, beispielsweise

30 hämatopoietische (Stamm)zellen aus dem Knochenmark oder andere adulte Stammzellen (vor allem Gewebespezifische Stammzellen), dem betroffenen Patienten entnommen werden und nach Maßgabe der im Stand der Technik bekannten Verfahren in-vitro kultiviert werden. Die entsprechend

35 ausgestalteten Vektoren mit den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen werden dann in-vitro den Zellen oder

Gewebe zugegeben, wobei vorzugsweise die Inkorporation derartiger Vektoren in die Zellen durch Elektroporation erfolgt. Die derart modifizierten Zellen oder Gewebe werden schließlich dem betroffenen Patienten reimplantiert. Derartige gentherapeutische Verfahren werden als ex-vivo-Gentherapie bezeichnet. Für beide gentherapeutische Ansätze, also in-vivo- oder ex-vivo-Verfahren, können erfindungsgemäße Nukleotidsequenzen operativ mit einer regulatorischen DNA-Sequenz verbunden werden, wobei es sich auch um eine heterologe regulatorische DNA-Sequenz handeln kann, so daß ein rekombinantes Konstrukt in der transfizierten Zelle vorliegt. Dieses Konstrukt kann dann in den Vektor inseriert werden und schließlich direkt dem betroffenen Patienten in einem in-vivo-Gentherapieansatz bzw. den Zellen oder Geweben des betroffenen Patienten in einem ex-vivo-Gentherapieansatz zugeführt werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das genetische Konstrukt in die Zellen oder die Gewebe des Tieres, entweder in-vivo- oder ex-vivo in einem molekularen Konjugat mit einem Virus, (beispielsweise einem Adenovirus oder viralen Komponenten (beispielsweise viralen Capsid-Proteinen) zugeführt werden. Die oben beschriebenen gentherapeutischen Ansätze können entweder (a) zu einer homologen Rekombination zwischen der Nukleotidsequenz und dem infunktionellen Gen in den Zellen des betroffenen Tieres oder (b) zu einer zufälligen Insertion des Gens an einer beliebigen Stelle im Wirtszellgenom oder (c) zur Inkorporation des Gens in den Zellkern führen, wobei es dann als extrachromosomales genetisches Element vorliegen kann. Die Offenbarung derartiger Verfahren und Ansätze zur Gentherapie können dem US-Patent US 5,578,461, der WO 94/12650 und der WO 93/09222 entnommen werden, die Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung sind. Die transfizierten Wirtszellen, die homolog oder

heterolog sein können, können mit einer semipermeablen Schicht eingehüllt werden und derart in die betroffenen Patienten reimplantiert werden, wobei auf diese Weise ein Angriff des Immunsystems des Patienten auf die reimplantierten Zellen verhindert wird (siehe WO 93/09222).

Bevorzugt ist dabei die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder eines erfindungsgemäßen Genprodukts, wenn es sich bei der Erkrankung um eine solche mit einer überschießenden Entzündungsreaktion handelt (Anspruch 18). Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung einer solchen DNA-Sequenz oder eines solchen Genprodukts zur Behandlung (zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung) von Psoriasis, Arteriosklerose, bakteriellen oder viralen Infektionserkrankungen, insbesondere bakterieller oder viraler Meningitis oder bakterieller Pneumonie, multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Asthma, Sarkoidose, glomerulärer Nephritis oder Osteoarthritis (Anspruch 19). Dies kann bspw. durch Fragmente erreicht werden, die die Signaltransduktion blockieren, bspw. um Sequenzen, die nur für die PYD-Domäne (oder Teile hiervon) codieren bzw. nur diese enthalten.

Gemäß einem weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird eine Verbindung zur Verfügung gestellt, die dadurch gekennzeichnet, daß sie die Funktion der erfindungsgemäßen Genprodukte (Proteine) als intrazelluläres Signalmolekül einer inflammatorischen Signalkaskade zur Auslösung von Entzündungsreaktionen inhibiert. Insbesondere blockieren erfindungsgemäße Verbindungen die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung (Anspruch 20). Bevorzugt handelt es sich bei einer erfindungsgemäßen chemischen Verbindung, die die erfindungsgemäße PYD-Funktion (bspw. bei Inflammation oder Apoptose)



blockiert, um ein Oligopeptid, das chemisch modifiziert (bspw. zur erleichterten Passage durch die Zellmembran, insbesondere durch endständige (vor allem N-terminale) Sequenzbereiche) sein kann oder nicht-modifiziert sein  
5 kann. Insbesondere kann es sich um einen an der PYD-Assoziierung beteiligten nativen Sequenzbereich eines erfindungsgemäßen Proteins handeln. Zu nennen wären bspw. sog. DN-Varianten (bspw. die AS 1 bis 94 von humanem Pycard oder entsprechende PYD-Domänen von NALP-Proteinen  
10 (s. Figur 1)), die bspw. auch die nachfolgend beschriebenen gentherapeutischen Verfahren verabreicht werden können. Derartige DN-Varianten können auch ausschließlich die NAD-Domäne oder einen Teil derselben oder eine die LRR-Domäne oder einen Teil derselben oder  
15 eine CARD-Domäne oder einen Teil derselben enthalten und auf diese Weise dominant negativ die Signalkaskade, insbesondere inflammatorische Signalkaskaden blockieren. Weiter unten sind die medizinischen Indikationen für Verwendung (Arzneimittelherstellung) derartiger DN-Varianten nativer  
20 erfindungsgemäßer Sequenzen offenbart. Erfindungsgemäß werden somit Sequenzen einzelner Domänen (LRR, PYD, CARD, NAD) erfindungsgemäßer Sequenzen offenbart.

Damit kann bspw. ein erfindungsgemäße inhibitorisches Molekül, vorzugsweise ein Tetra- bis Dodekamer, eine dem  
25 nativen Substrat entsprechende Aminosäuresequenz enthalten oder aus einer nativen Substratsequenz bestehen, wobei das vorzugsweise Tetra- bis Dodekamer typischerweise auch einen Sequenzabschnitt aus einer PYD-Domäne eines erfindungsgemäßen Proteins aufweist. Ggf.  
30 kann ein derartiges Oligopeptid auch dadurch chemisch modifiziert sein, daß die amidartige Bindung zwischen den einzelnen Aminosäuren durch eine gegen proteolytischen Abbau resistente alternative chemische Gruppe (bspw. Schwefel- oder Phosphorbrücken) ersetzt wird.

35 Eine erfindungsgemäße chemische Verbindung ist vorzugsweise eine organisch-chemische Verbindung mit

einem Molekulargewicht von <5000, insbesondere <3000, vor allem <1500 und ist typischerweise physiologisch gut verträglich (Anspruch 21). Ggf. wird sie Bestandteil einer Zusammensetzung mit mindestens einem weiteren  
5 Wirkstoff sowie vorzugsweise Hilfs- und/oder Zusatzstoffen sein und als Arzneimittel eingesetzt werden können. Besonders bevorzugt wird das organische Molekül dann sein, wenn die Bindungskonstante für die Bindung an ein erfindungsgemäßes Protein, insbesondere an die  
10 Domäne PYD eines erfindungsgemäßen Proteins, mindestens  $10^7 \text{ mol}^{-1}$  beträgt. Die erfindungsgemäße Verbindung wird vorzugsweise so beschaffen sein, daß sie die Zellmembran passieren kann, sei es durch Diffusion oder über (intra)membranöse Transportproteine (Anspruch 22).

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die erfindungsgemäße Verbindung ein Antikörper, vorzugsweise ein gegen die PYD-Domäne eines erfindungsgemäßen Proteins gerichteter  
20 Antikörper, der ex vivo in retransplantierte Wirtszellen oder durch gentherapeutische in vivo Verfahren in Wirtszellen eingeschleust wird und dort als "intrabody" nicht sekretiert wird, sondern intrazellulär seine Wirkung entfalten kann. Durch derartige erfindungsgemäße  
25 "Intrabodies" sind die Zellen vor einer inflammatorischen Reaktion geschützt. Eine derartige Vorgehensweise wird typischerweise für Zellen jener Gewebe in Betracht kommen, die beim Patienten eine pathophysiologisch übersteigertes inflammatorisches Verhalten zeigen, also  
30 bspw. bei Hepatocyten (Leberentzündung), Keratinozyten, Bindegewebszellen, Immunzellen oder Muskelzellen. Entsprechend sind auch derartig mit erfindungsgemäßen "Intrabodies" gentherapeutisch modifizierte Zellen Bestandteil der vorliegenden Erfindung.

35 Im einzelnen eignen sich erfindungsgemäße Antikörper gegen erfindungsgemäße Aminosäuresequenzen, insbesondere

erfindungsgemäße Antikörper, die gegen eine PYD-Domäne gerichtete sind, dann besonders, wenn sie beispielsweise als "single-chainFv" (scFv) oder Fab-Fragmente vorliegen und zur Erkennung der Zielstruktur (bspw. der PYD-Domäne) in verschiedene subzelluläre Kompartimente geleitet werden können, um dort die Aktivität des Zielmoleküls entweder direkt oder indirekt durch Interferenz mit den subzellulären Transportwegen zu blockieren. Beispielsweise kann für eine zielgerichtete subzelluläre Positionierung des Intrabodies ein ER-Retensionssignal (KDEL) an den C-Terminus des Antikörperfragments mit einer sogenannten "Leader-Sequenz" angehängt werden, was zu einer Retention im Lumen des endoplasmatischen Retikulums führt. Durch eine entsprechende mitochondriale Leadersequenz, beispielsweise der Cytochrom C-Oxidaseeinheit VIII, kann ein Transport in die Mitochondrien erreicht werden. Die cytoplasmatische Expression des Antikörpers wird dadurch sichergestellt, daß die Expression der Antikörperfragmente ohne irgendeine Signal- oder Leader-Sequenz erfolgt. Auch ein Transport in den Nukleus ist möglich, indem zum Beispiel vom großen SV 40 T-Antigen eine nukleäre Lokalisationssequenz gewählt wird (PKKKRKV), und zwar entweder am N- oder C-Terminus. Entsprechende technische Maßnahmen müssen eingesetzt werden, um die Expression im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas unter Ausbildung von Disulfid-Brücken sicherstellen zu können. Die nachfolgenden Veröffentlichungen aus dem Stand der Technik werden inhaltlich explizit in die vorliegende Offenbarung miteinbezogen (Marasco, 1997, Gene Therapy. 4, 11-15; Richardson, & Marasco, 1995, Trends Biotechnology 13, 306 - 310; Biocca und Cattaneo 1995, Trends Cell Biology 5, 248 - 252; Biocca et al, 1995, Bio/Techn. 13, 1110-1115, Biocca et al, 1990, EMBO Journal 9, 101 - 108; Piche et al, 1998, Cancer Research 58, 2134 - 2140; Rosso et al, 1996, Biochem. Biophys. Res. Communication 220, 255 bis 263).

Als weitere bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen (bspw. zur Inhibition von molekularen Mechanismen, die für überschießende Entzündungsereignisse ursächlich sind) kommen auch Sequenzen (DNA oder RNA) in Betracht, die im Zusammenhang mit anti-sense Technologien stehen. In diesem Fall werden antisense DNA oder RNA in Zellen eingeschleust (bspw. durch gentherapeutische Ansätze, bspw. Verwendung rekombinanter Viren, s.o.) und diese können auf diese Weise durch komplementäre Bindung transkribierter mRNA (für erfindungsgemäße PYD-Domänen enthaltende Proteine) die Translation der dazu gehörigen polymorphen genomischen Sequenz blockieren. Eine derartige Vorgehensweise ist insbesondere bei Patienten deren Expressionsniveaux von PYD-Domänen enthaltenden Proteinen pathologisch erhöht ist, relevant.

Weitere Verbindungen bzw. Therapieverfahren zur Behandlung der offenbarten medizinischen Indikationen (bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels) beruhen auf Ribozym-Methoden. Hierzu werden Ribozyme verwendet, die eine Ziel-mRNA schneiden können. Im vorliegenden Fall werden daher Ribozyme offenbart, die native mRNA von erfindungsgemäßen Proteinen (bspw. NALP1 oder anderen PYD-Domänen enthaltenden Proteinen) spalten können. Erfindungsgemäße Ribozyme müssen dabei mit der erfindungsgemäßen Ziel-mRNA interagieren können, bspw. über Basenpaarung, und anschließend die mRNA spalten, um die Translation von bspw. NALP1 oder Pycard zu blockieren. Die erfindungsgemäßen Ribozyme werden über geeignete Vektoren in die Zielzellen geschleust (insbesondere Plasmide, modifizierte Tierviren, insbesondere Retroviren), wobei die Vektoren neben ggf. anderen Sequenzen eine cDNA -Sequenz für ein erfindungsgemäßes Ribozym aufweist.

Eine erfindungsgemäße chemische Verbindung mit der Funktion der Blockade der bspw. inflammatorischen

Funktion von erfindungsgemäßen physiologischen Proteinen (s. Fig. 1) kann als Arzneimittel Verwendung finden. Insbesondere ist eine erfindungsgemäße chemische Verbindung (zur Herstellung eines Arzneimittels) zur Behandlung von Erkrankungen, für die zumindest tw. eine pathologische hyperinflammatorische Reaktion kausal oder symptomatisch ist, geeignet. Damit kann ein erfindungsgemäßer Inhibitor der zellulären Funktion eines erfindungsgemäßen Proteins, also bspw. der inflammatorischen Reaktion, insbesondere ein Inhibitor der Assoziierung von PYD-Domänen, zur Inflammationsinhibition ganz besonders bei der Behandlung der folgenden Erkrankungen bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der folgenden Erkrankungen eingesetzt werden: Autoimmunerkrankungen, Psoriasis, Arteriosklerose, bakterielle oder virale Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma, Sarkoidose, glomeruläre Nephritis oder Osteoarthritis, Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (Anspruch 23).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren ("Screening-Methoden") zur Identifizierung von Verbindungen (organisch-chemischen Verbindungen, Biomoleküle (bspw. Oligonukleotide, Antikörper oder Antikörperfragmente, Oligopeptide, Ribozyme, DN-Mutanten von erfindungsgemäßen Proteinen) mit inhibitorischen Eigenschaften in Hinblick auf die Auslösung oder Weiterleitung von Signalen, die mit inflammatorischen Reaktionen in Zusammenhang stehen, insbesondere von Verbindungen die die Interaktion von Proteinen der inflammatorischen Signalkaskade, insbesondere von physiologisch miteinander reagierenden PYD-Domänen (gleicher oder verschiedener Proteine) blockieren (bspw. die Assoziierung des Inflammasoms blockieren, indem bspw. die Assoziierung von NALP1 und Pycard inhibiert wird).

Andere erfindungsgemäße Angriffspunkte der Interaktion sind bspw. die Inhibition der Interaktion zwischen der CARD-Domäne von Caspase-1 und der CARD-Domäne von Pycard oder die Inhibition der Interaktion der CARD-Domäne von Caspase-5 und NALP1. Schließlich kann es auch bevorzugt sein, dass erfindungsgemäße Verbindungen die Wechselwirkung der LRR-Domäne von Proteinen der NALP-Klasse, bspw. NALP1, mit weiter stromaufwärts liegenden Proteinen oder Stimuli, modulieren (blockieren oder aktivieren). Ggf. können auch Verbindungen, die als Aktivatoren der vorgenannten Interaktionen wirken, bevorzugt sein.

Erfindungsgemäße Verfahren sehen vor, daß (a) Zellen, vor allem Hepatocyten, insbesondere T-Lymphozyten, so modifiziert werden, daß sie eine inflammatorische Reaktion zeigen, (b) diese gemäß (a) modifizierten Zellen in einer Zellkultur bereitgestellt werden, (c) Testsubstanzen zur Zellkultur zugegeben werden, (d) die das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion der Zellen in der Zellkultur bestimmt wird. Hierzu werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise mehrere parallele Versuche mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanz angesetzt, um im Falle einer die Inflammation inhibierenden Wirkung der Testsubstanz deren ID<sub>50</sub>-Wert bestimmen zu können.

Alternativ kann ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung der vorgenannten Verbindungen auch die folgenden Schritte umfassen: (a) ein in vitro Testsystem bereitgestellt wird, das mindestens eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz enthält, (b) in Form eines Hochdurchsatz-"Screenings" potentielle Wirkstoffsubstanzen dem gemäß (a) bereitgestellten in vitro Testsystem zugeführt werden, und (c) ein physikalisches, chemisches oder biologisches Signal in dem Testsystem zur Identifikation von Wirkstoffsubstanzen detektiert wird. Chemische Bibliotheken können durchsucht werden, und zwar sowohl

nach aktivierenden oder inhibierenden Substanzen. In diesem Zusammenhang wird auf die Offenbarung des Lehrbuchs von Böhm, Klebe und Kubinyi (Wirkstoffdesign, 1996, Spektrum-Verlag, Heidelberg) verwiesen, auf das diesbezüglich vollinhaltlich Bezug genommen wird. Insbesondere können Verbindungen, die einem der vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert werden, auch geeignet sein, das Expressionsniveau des nativer erfindungsgemäßer Sequenzen, bspw. von Pycard oder NALP1, beeinflussen. Der Wirkungsmechanismus kann auf einer Beeinflussung bspw. der Aktivität des nativen Promotors beruhen, so dass die Transkriptionsaktivität moduliert wird.

Ein erfindungsgemäßes "Screening"-Verfahren kann auch mit Hilfe von sogenannten "Proteomics"-Techniken durchgeführt werden. Hierzu werden zur Bestimmung eines Standards typische Unterschiede im Expressionsmuster von Zellen mit inflammatorischer Reaktion und Kontrollzellen experimentell erhoben. Methodisch wird für ein derartiges Verfahren typischerweise die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Testsubstanzen, die das Expressionsmuster erfindungsgemäßer Substanzen verändern, können dann auf Grund der veränderten Expressionsmuster erkannt werden (s. auch die Offenbarung bei Rehm, H., Der Experimentator, Spektrum-Verlag, 2000)

Über Strukturanalysen eines erfindungsgemäßen Proteins lassen sich gezielt außerdem erfindungsgemäße Verbindungen finden, die eine spezifische Bindungsaffinität aufweisen (Rationales Drug Design (Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg)). Hier wird die Struktur oder eine Teilstruktur, Derivat, Allel, Isoform oder ein Teil einer solchen von einem der erfindungsgemäßen Proteine über NMR- oder Röntgenkristallographie-Verfahren (nach entsprechender Kristallisierung, z.B. nach der Methode des „hängenden Tropfens“) ermittelt oder, sofern eine

solche hochaufgelöste Struktur nicht vorliegt, mit Hilfe von Strukturvorhersage-Algorithmen ein Strukturmodell eines erfindungsgemäßen Proteins, bspw. auch mit Hilfe von homologen bereits strukturell aufgeklärten Proteinen (z.B. von Rhodopsin), erstellt, und diese(s) benutzt, um mit Unterstützung von Molecular Modelling Programmen Verbindungen, die als Agonisten oder Antagonisten wirken können, zu identifizieren, für die sich eine hohe Affinität zum erfindungsgemäßen Protein vorhersagen läßt. Ggf. lassen sich die oben bezeichneten Verfahren zur Strukturaufklärung auch miteinander kombinieren. Geeignete Kraftfelder werden zur Simulation der Affinität einer potentiell affinen Verbindung an eine interessante Substruktur eines erfindungsgemäßen Proteins, bspw. das aktive Zentrum, eine Bindungstasche oder eine „hinge“-Region, eingesetzt. Diese Substanzen werden dann synthetisiert und in geeigneten Testverfahren auf ihr Bindungsvermögen und ihre therapeutische Nutzbarkeit getestet. Derartige in silico Verfahren zur Identifizierung potentieller Wirkstoffe, die ihre Wirkung durch Bindung an erfindungsgemäße PYD-Domänen-Proteine entfalten, sind gleichfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ferner werden auch, insbesondere in-vitro Verfahren offenbart, die es erlauben, nativ auftretende Polymorphismen der erfindungsgemäßen Proteine zu identifizieren. Für derartige Verwendungszwecke eignen sich insbesondere PCR-Methoden, insbesondere auch RT-PCR-Verfahren, also die Diagnose auf der Basis von mRNA, die in vitro entsprechend in cDNA übersetzt wird und dann mit Hilfe von herkömmlichen PCR-Verfahren vervielfältigt wird. Auch entsprechende Array-Techniken, die erfindungsgemäße Oligonukleotide auf einem Chip positionieren, erlauben die Diagnostik mit Hilfe von Hybridisierungsreaktionen. Hierbei wird die Patientenprobe gegen einen Array mit erfindungsgemäßen Oligonukleotiden, die die erfindungsgemäßen



Polymorphismen einschließen, getestet. Positive Signale auf dem Array bei Oligonukleotiden, die mit Entzündungserkrankungen gekoppelte Polymorphismen aufweisen, lassen eine entsprechende Diagnose zu.

5 Schließlich sind Oligopeptide Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die mindestens 20, stärker bevorzugt mindestens 30 und noch stärker bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren umfassende Teilabschnitte der gemäß Figur 1  
10 offenbarten Proteinsequenzen, insbesondere Sequenzen mit den Nummern 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, ..., 1.20. Derartige Teilsequenzen können nach dem Fachmann geläufigen Verfahren bspw. chemisch synthetisiert werden und können  
15 vorzugsweise als Antigene für die Produktion von Antikörpern eingesetzt werden. Vorzugsweise wird es sich bei diesen Teilabschnitten von erfindungsgemäßen Proteinen bzw. deren Derivaten, Allelen oder Fragmenten  
offenbarten Sequenzen handeln, die im räumlichen Modell der Proteine solche Regionen besetzen, die zumindest teilweise die Proteinoberfläche ausmachen. Bevorzugte  
20 Teilsequenzen von mindestens 20 AS Länge werden zumindest tw. die PYD-Domäne (s. Figur 7) (oder im Falle der Proteine der Klasse der NALP-Proteine die NAD-Domäne) der erfindungsgemäßen Proteine umfassen, insbesondere  
bevorzugt wird ein erfindungsgemäßer Teilabschnitt  
25 mindestens 20 AS lange Peptide einer der erfindungsgemäßen Sequenzen gemäß Figur 7 zwischen Position 1 und Position 30 (gemäß Figur 7) aufweisen, bspw. das Peptid LENLP AEELKKFKLKL SVPL (Position 1 bis  
21, 21 AS Länge von humanem Pycard) oder die  
30 entsprechenden aus Figur 7 entnehmbaren Sequenzen der weiteren erfindungsgemäßen Sequenzen, insbesondere aus der Klasse der NALP-Proteine.

35 Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Figur 1 stellt DNA-Sequenzen (einschließlich der entsprechenden Aminosäuresequenzen) dar, die an der inflammatorischen Signalkaskade beteiligt sind.

Fig. 2 zeigt eine Zusammenfassung der vorgenannten Sequenzen in tabellarischer Form, geordnet nach den in Fig. 1 bereits verwendeten Bezeichnungen, wobei etwaige EST-Klone, die Herkunft der Sequenz, die Lokalisierung auf einem Chromosom sowie eine Zusammenfassung der in den jeweiligen Sequenzen enthaltenen Domänen (z. B. die PYD-Domäne, SPRY-Domäne, CARD-Domäne, NACHT-Domäne, die LRR-Domäne) angegeben sind. Unter (A), (B) und (C) sind die Sequenzen humanen Ursprungs zusammengefaßt, (D) enthält dagegen murine Sequenzen.

Fig. 3 zeigt das generalisierte "PYD"-Suchprofil, das eingesetzt wurde, um weitere PYD-Proteine in bspw. EST-Datenbanken aufzufinden. Hierbei wird auf die Veröffentlichung von Bucher et al. (1996, Computer Chem., 20, 3-24) und auf die entsprechenden Erläuterungen in der offengelegten deutschen Patentanmeldung DE 197 13 393.2-41 verwiesen, die beide insoweit Bestandteil der vorliegenden Anmeldung sind. Hierdurch wurden zwei weitere PYD-enthaltende Proteine identifiziert, nämlich NALP1 und NALP2 (die Bezeichnung NALP setzt sich aus den einzelnen in beiden Proteinen auftretenden charakteristischen Domänen zusammen: Domäne NACHT, LRR und PYD). Beide Proteine spielen eine entscheidende Rolle als Signaltransduktionsproteine für inflammatorische Signale. Des weiteren kommt auch deren Funktion und damit Verwendung im Zusammenhang mit der apoptotischen Signalproteintransduktion in Betracht.

Im Ergebnis zeigt Fig. 4, daß Pycard mit Hilfe seiner PYD-Domäne homodimerisiert und mit der PYD-Domäne von NALP1 interagiert. In der mittleren Darstellung wurden Zellextrakte, lysiert 24 Stunden nach der Transfektion, herangezogen und die anti-Flag-Immunopräzipitate auf die

Anwesenheit von VSV-Pycard untersucht. In der unteren Darstellung wurden die verschiedenen Flag-markierten Konstrukte (nämlich Pycard-PYD (also PYD von Pycard)), RAIDD, Apaf1-CARD (CARD von Apaf1, NALP1-PYD (PYD von NALP1), NALP1-CARD (CARD von NALP1) und ein Scheinvektor, in Hinblick auf ihre jeweilige Anwesenheit im Immunopräzipitat durch anti-Flag-Antikörper untersucht.

Fig. 5 zeigt im Teil A eine Ausrichtung von PYD-Domänen aus verschiedenen Proteinen ("alignment" vom N-Terminus zum C-Terminus). Die jeweiligen Sequenzpositionen mit einer mindestens 50%igen Identität bzw. mit zumindest ähnlichen Aminosäuren sind schwarz bzw. mit grauem Hintergrund unterlegt. Die Abkürzungen stehen für HS: homo sapiens und DR: Danio rerio (Zebrafisch). Die jeweiligen Zugangsnummern bei der Datenbank "Gen Bank" (EMBL) sind die folgenden: AF310103 für humanes Pycard, AF310104 für murines Pycard, O15553 für Pyrin, AF310105 für NALP1, AF310106 für NALP2, AAF66964 für das Protein CASPY vom Zebrafisch, AAF66956 für das Protein Pycard vom Zebrafisch.

Fig. 5B stellt in schematischer Weise die Domän-Struktur von Proteinen mit einer PYD-Domäne (Pyrin-Domäne) dar. Die Namensgebung für die einzelnen Homologiedomänen ist zu entnehmen der Figurenlegende in Anlage A12 unter Fig. 5.

Fig. 5C stellt die Aminosäuresequenz von NALP1 dar. Die verschiedenen Schattierungen entsprechen den für Fig. 5B gewählten domänenspezifischen Schattierungen: dunkelgrauer Hintergrund: PYD-Domäne, eingerahmter heller Hintergrund NALP1-Domäne, hellgrauer Hintergrund: LRR-Domäne und dunkler Hintergrund: CARD-Domäne.

Fig. 6 stellt eine Ausrichtung ("alignment") von repräsentativen Pyrin-Domänen (PYD-Domäne) Todeseffektordomäne (DED) und Caspase-Rekrutierungsdomän

(CARD) und Todesdomäne (DD) dar. Die Ähnlichkeit der verschiedenen Domänen wird durch korrespondierende Aminosäuren, die schattiert dargestellt sind, deutlich. Auch auf dem Niveau der Sekundärstruktur gibt es erhebliche Ähnlichkeiten, wie durch die Sekundärstruktur-Vorhersage (hier für jeweils 6  $\alpha$ -Helices) deutlich wird.

Fig. 7 stellt eine Ausrichtung (vom N- zum C-Terminus, "alignment") von Aminosäuresequenzen der PYD-Domänen der folgenden Proteine dar: Pyrin, vom Menschen (hs), von der Maus (mm) und rn, Pycard vom Menschen und von der Maus menschliches Pyc, menschliches NALP1, menschliches NALP2, menschliches NALP3, menschliches NALP4, menschliches NALP5, menschliches NALP6, menschliches NALP7, menschliches NALP8, menschliches NALP9, menschliches NALP10, menschliches NALP11, murines NALP12, menschliches NALP13, murines NALP14, menschliches NALP15, menschliches PY10, murines PY16, CASPY1 vom Zebrafisch, CASPY2 vom Zebrafisch, Pycard vom Zebrafisch. In der letzten Zeile ist eine Hervorhebung der in einer Consensus-Sequenz auftretenden Sequenzposition markiert.

Fig. 8 stellt einen Stammbaum der identifizierten PYD-Domänen enthaltenden Proteine dar, wobei die Nähe des Verwandtschaftsgrades in diesem Stammbaum berücksichtigt ist. Damit zeigt der Stammbaum die vermeintliche Divergenz von durch genomischen evolutionär bedingten Duplizierungen erhaltenen Stammbaums.

Figur 9 zeigt, daß Pycard und NALP1 assoziieren und proinflammatorische Caspasen aktivieren können. Figur 9a stellt hierbei in schematisierter Form die Domänenstruktur von Apaf-1, NOD1, erfindungsgemäßem NALP1 und erfindungsgemäßem Pycard (Asc) dar. Die beiden aus dem Stand der Technik bekannten Proteine Apaf-1 und NOD1 weisen eine strukturelle Verwandtschaft mit den erfindungsgemäßen Proteinen auf. Hierbei sind die einzelnen Domänen mit Ihren Kurzbezeichnungen in Figur 9a

5 eingezeichnet, nämlich die Domänen CARD, PYD (Pyrin-Domäne), LRR ("Leucin-Rich"-Repeats), NBS (Nukleotid-Bindungsdomäne), WD-Domänen und eine in allen erfindungsgemäßen Proteinen der NALP-Klasse auftretende und hochkonservierte Domäne NAD (NALP-assoziierte Domäne). Die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 und Pycard weisen darüber hinaus jeweils die charakteristische PYD-Domäne auf, über die die beiden Proteine erfindungsgemäß interagieren können.

10 Figur 9b stellt dar, daß die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 und Pycard nicht an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt sind. Hierzu wurden 293T-Zellen mit Plasmidkonstrukten von NOD1, RIP2, NALP1, NALP1-Nter, 15 NALP1-Cter und Pycard sowie mit einem "Mock"-Vektor und mit NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reporter-Plasmiden transfiziert und die relative NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität 24 Stunden nach Transfektion ermittelt. Es ist ohne weiteres erkennbar, daß ausschließlich die beiden Proteine NOD1 20 und RIP2 an der Induktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligt sind, während die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 (bzw. Fragmente von NALP1) und Pycard eine Transkriptions-Aktivität auf dem Niveau des Mock-Vektors aufweisen, also NF- $\kappa$ B nicht aktivieren.

25 Figur 9c stellt in der linken Auftragung Blots von überexprimiertem NALP1 Cter (AS 1030 bis 1430, die die NAD und CARD-Domäne enthalten) dar, wodurch eine Caspase-5 Prozessierung induziert wird. Hierzu wurden 293T-Zellen 30 mit 0,5  $\mu$ g eines Caspase-5-Plasmids und der indizierten Menge an NALP1-Cter-, Pycard- oder FADD-Expressionsplasmiden transfiziert. Im dargestellten Western-Blot wurde Caspase-5 mit anti-Caspase-5-Antikörper bzw. NALP1 mit anti-Flag-Antikörper 35 detektiert. Bei einer Menge von 3  $\mu$ g NALP1-Cter-

Expressionsplasmid war ein Expressionssignal der Procaspase im Zellextrakt bei Verwendung von anti-Caspase-5-Antikörpern kaum noch erkennbar, d.h. Caspase-5 war weitestgehend prozessiert worden. In der mittleren Auftragung von Figur 9c ist erkennbar, daß NALP1 mit Caspase-5 interagiert. Hierzu wurde Caspase-5 (2 µg) mit 2 µg der indizierten Flag-markierten Expressionskonstrukte koexprimiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die anti-Flag (M2)-Immunopräzipitate (IP) im Hinblick auf die Anwesenheit von Caspase-5 analysiert, und die Zellextrakte (xt) wurden mit den angegebenen Antikörpern immunogeblottet. Während im Zellextrakt (unterer Abschnitt der mittleren Figur) bei Koexpression mit NALP1-Cter kein Caspase-5-Signal nach Einsatz von anti-Caspase-5-Antikörpern erkennbar war, geben die übrigen Versuchsansätze Banden für Caspase-5. In allen Versuchsansätzen (bis auf den Mock-Vektor) sind die entsprechenden Flag-markierten Konstrukte durch anti-Flag-Antikörper nachweisbar. Im Immunipräzipitat ist Caspase-5 bzw. p35 nachweisbar. p35 ist ein Caspase-5 Spaltprodukt, das die CARD-Domäne und die p20 Caspase-Untereinheit enthält. Das \* in Figur 9c (mittlere Darstellung, oben) zeigt die Position der IgG schwere Kette an. In der rechten Auftragung von Figur 9c sind die Interaktion der verschiedenen CARD-Caspasen mit NALP1-Cter und dem Protein Raidd dargestellt. Die beiden vorgenannten Proteine wurden Flag-markiert und mit polyklonalem anti-Flag-Antikörper immunipräzipitiert. Die Caspasen wurden durch ihre HA (Hämagglutinin)-Markierung detektiert. Eine Bande war für Caspase-5 bei Zugabe von erfindungsgemäßem NALP1-Cter deutlich erkennbar, schwache Signale auch für Caspase-2 und Caspase-4, d.h. die C-terminale CARD-Domäne von NALP1 interagierte am stärksten mit Caspase-5. Mit Caspase-9 konnte keine Interaktion beobachtet werden.

Figur 9d enthält in der linken Darstellung die Ergebnisse von Versuchen, die zeigen, daß die Überexpression von erfindungsgemäßen Pycard die Spaltung von Caspase-1 induziert. Hierzu wurde analog zu Figur 9c (dort für erfindungsgemäßes NALP1-Cter) das Zellextrakt untersucht. Hierbei zeigte sich, daß bei erhöhten Pycard-Konzentrationen, wie im mittleren Abschnitt von Figur 9d (linke Auftragung) durch anti-Pycard-Antikörper gezeigt, eine deutliche Reduktion der Caspase-1-Konzentration im Zellextrakt nachweisbar war, verglichen mit den übrigen Banden, beispielsweise bei NALP1-Cter Zugabe oder FADD Zugabe. In der rechten Darstellung von Figur 9d wird gezeigt, daß Pycard gemeinsam mit Caspase-1 koimmunopräzipitiert. Der verwendete Antikörper ist gegen den N-terminalen Abschnitt (CARD) von Caspase-1 gerichtet. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die CARD-Domäne von Pycard stark mit der Caspase-1 interagiert und deren Aktivierung anstößt. Erfindungsgemäßes Pycard verbindet also als Adapter NALP1 und Caspase-1.

Figur 10 gibt die Ergebnisse von Experimenten wieder, die zeigen, daß die kombinierte Expression von Caspase-1 und Caspase-5 eine optimale Spaltung von pro-IL1 $\beta$  induziert. Hierbei wurden, wie in Figur 10a dargestellt, 293T-Zellen mit gleichen Mengen von aktivierten Caspase-1 und Caspase-5 Expressionskonstrukten gemeinsam mit entweder leeren Vektoren oder Expressionskonstrukten von NALP1-Cter und Pycard kotransfiziert. Die Caspase-induzierte Spaltung von pro-IL $\beta$  nach Aspartat 116 wurde unter Einsatz von Antikörpern, die spezifisch das p17 Spaltprodukt (IL-1 $\beta$ \*) von pro-IL1 $\beta$  binden können, detektiert. Die Zellextrakte wurden dann immunogeblottet, um die Expressionsniveaus der transfizierten Proteine bestimmen zu können. Hierbei zeigt sich im „Western Blot“ von Figur 10a, daß bei einer Kombination von Pycard,

NALP1-Cter, Caspase-1 und Caspase-5 mit Hilfe von anti-IL1 $\beta$ \*-Antikörpern IL-1 $\beta$ \* detektiert werden kann (s. Figur 10a oben). Die beiden Bildausschnitte im unteren Teil von Figur 10a geben die Kontrollexperimente mit Anti-Flag bzw. Anti-Pycard-Antikörpern wieder. Diese Ergebnisse entsprechen der Verteilung der entsprechenden Zielproteine in den vier Versuchsansätzen. Das Caspase-5-Spaltprodukt p35 ist mit anti-Caspase-5-Antikörper deutlich sichtbar nur in der rechten Spur der Auftragung in Figur 10a nachweisbar.

Figur 10b entspricht Figur 10a abgesehen davon, daß gleiche Mengen der Aktivatoren NALP1-Cter und Pycard mit pro-IL1 $\beta$  kotransfiziert wurden und daß die Caspasen jeweils eigenständig exprimiert oder coexprimiert (rechte Spur) wurden. Das Spaltprodukt IL1 $\beta$ \* ist nur im Western Blot in der rechten Spur, also nach Coexpression, mit den entsprechenden Antikörpern nachweisbar.

Figur 11 stellt die parallele Aktivierung von Caspase-1 und Caspase-5 während der pro-IL1 $\beta$  Prozessierung in THP.1 Zellen, also unter physiologischen Bedingungen, dar. Hierbei wurde zunächst gemäß Figur 11a die Expression von NALP1, Pycard und Caspase-1 in verschiedenen Zelllinien durch Western-Blot-Analyse untersucht (293T-Zellen, Jurkat-Zellen, EL4-Zellen, A20, Raji-, Ramos-, BJAB-, THP-1-, U937-, K562-, Raw-, HeLa-Zellen). Hierzu wurden die Zellektrakte (30  $\mu$ g) mit polyklonalen Antikörpern gegen NALP1 sowie Pycard und monoklonalen Antikörpern gegen Caspase-1 versetzt. Die vorgenannten Zelllinien sind alle humanen Ursprungs, abgesehen von den Lymphozyten-Zelllinien A20 und EL4, die von Mäusen stammen. Das \* bezieht sich auf ein Protein, das mit dem anti-Pycard-Antikörper kreuzreagiert und das wahrscheinlich einer kürzeren, alternative Spleißversion



von Pycard entspricht. In der rechten Auftragung von Figur 11a wurde eine Spezifitätskontrolle der in dieser Untersuchung verwendeten Antikörper durchgeführt. Hierzu wurden 293T-Zellen mit NALP1 und Pycard oder einem Mock-  
5 Expressionskonstrukt transfiziert, und die Zellysate wurden mit dem entsprechenden Antikörper versetzt. Insgesamt zeigte sich bei den in Figur 11a dargestellten Versuchen, daß THP-1-Zellen eine starke Expression sowohl von NALP1, von Pycard als auch von Caspase-1 besitzen.  
10 Sie eignen sich daher besonders als Untersuchungsobjekt für die Interaktion von NALP1, Pycard und Caspase-1. Die Spezifität der Antikörper ist, wie aus der rechten Auftragung in Figur 11a hervorgeht, ausgezeichnet.

15 In Figur 11b wurde die Expression von IL1 $\beta$  und Caspase-5 vor und nach Stimulierung mit LPS (1  $\mu$ g/ml, 1h, Bedingungen wie im folgenden für Figur 11c beschrieben, dargestellt). Nach Stimulierung mit LPS ist hierbei im Zellextrakt mit den entsprechenden Antikörpern sowohl  
20 Caspase-5 als auch pro-IL1- $\beta$  nachweisbar. THP1-Zellen exprimieren Caspase-5 jedoch auch ohne LPS-Aktivierung.

Figur 11c gibt die Ergebnisse von Versuchen wieder, die sich ergeben, wenn Zellysate von mit LPS prästimulierten  
25 THP.1-Zellen bei 30°C für die in Figur 11c oben dargestellten Zeiträume inkubiert wurden. Caspase-1-Aktivierung ist nämlich spontan zu beobachten, wenn cytoplasmatische Zellextrakte auf 30°C erwärmt werden. Es wurde die Aktivierung von Caspase-1, Caspase-5, Caspase-9  
30 und pro-IL1 $\beta$ , gefolgt vom Western Blotting in Gegenwart oder Abwesenheit von Caspase-Inhibitoren zVADfmk (50  $\mu$ M), YVADfmk (5  $\mu$ M) und Proteasom-Inhibitor LLnL (50  $\mu$ M) zeitabhängig ermittelt. Cytochrom C (1 ng) wurde zur Aktivierung von Apaf-1 und Caspase-9 hinzugegeben. Die  
35 monoklonalen Antikörper, die eingesetzt wurden, um

Caspase-5 und Caspase-9 zu detektieren, erkennen jeweils die p20-Untereinheit. In den vier Bildabschnitten der Figur 11c sind die jeweiligen Banden, die durch Markierung mit anti-Caspase-1-Antikörper, anti-Caspase-5-Antikörper, anti-Caspase-9-Antikörper und anti-IL1 $\beta$ -Antikörper erhalten werden, dargestellt. Hierbei ergab sich, dass Caspase-9 nur prozessiert wurde, wenn Cytochrom C dem Zellextrakt hinzugegeben wurde. Die Caspase-1 und Caspase-5 hingegen zeigen ähnliche Kinetiken, weswegen beide auf einem Caspase-9-unabhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert werden. Die Caspasen-1 und -5 werden jeweils zeitabhängig nach Aktivierung in ihre Spaltprodukte zerlegt (p20, p35, Nter). Gleichzeitig mit der Aktivierung der Caspasen-1 und -5 (Auftreten der Spaltprodukte) kann das p17-Fragment (aktives Spaltprodukt von proIL-1 $\beta$ ) detektiert werden. Bei Zugabe der beiden Caspase-1-Inhibitoren zVADfmk und YVADfmk wurde die proIL-1 $\beta$ -Aktivierung blockiert.

Schließlich sind in Figur 11d die Caspase-1, Caspase-5 und pro-IL1 $\beta$ -Aktivierung nach Stimulierung von THP1-Zellen durch LPS (10  $\mu$ g/ml) (anstelle der Erhöhung der Inkubationstemperatur, wie in Fig. 11c) wiedergegeben. Die THP1-Zellen wurden mit PMA vor der LPS-Zugabe prästimuliert. Die Aktivierung von pro-IL1 $\beta$ , Caspase-1 und Caspase-5 wurde sowohl in den Zellextrakten (xt) als auch in den Überständen (SN) gemessen. Die oberen drei Bildausschnitte stellen dabei die Messung in den Überständen (SN) dar, die unteren vier Bildausschnitte Messungen der Anwesenheit in Zellextrakten. Die einzelnen Spuren entsprechen unterschiedlichen Stimulationszeiträumen (mit oder ohne Zugabe von Caspase-Inhibitor zVAD). Die jeweils zur Detektion eingesetzten Antikörper sind links von den Bildausschnitten

verzeichnet, die entsprechenden Bandenpositionen sind rechts durch entsprechende Pfeile namentlich indiziert. PARP (unterster Bildausschnitt) ist ein Spaltprodukt, das der Caspase-3-Aktivierung erkennen läßt. Die Spaltung von pro-IL1 $\beta$  wurde durch einen Antikörper, der spezifisch die 5 gespaltene Form von pro-IL1 $\beta$ , also IL1 $\beta$ \*, erkennt, detektiert (anti-IL1 $\beta$ \*). Während in den Zellextrakten keine aktiven Formen von Caspase-1 oder Caspase-5 auftreten, sind diese ebenso wie die aktive Form p17 10 (aktives Spaltprodukt von proIL-1 $\beta$ ) in den Überständen nachweisbar. D.h. aktive Formen von Caspase-1 und Caspase-5 werden aus den Zellen gemeinsam mit p17 in den Überstand sezerniert. Eine Spaltung (Aktivierung) von PARP als proapoptotisches Signal (unterster 15 Bildausschnitt) findet dagegen erwartungsgemäß nicht statt.

Um zu überprüfen, ob NALP1, Caspase-1, Caspase-5 und Pycard tatsächlich zur Aktivierung von proIL-1 $\beta$  20 zusammenwirken, wurden nicht-aktivierte Zellextrakte von THP1-Zellen mit Gelfiltrationsmethoden untersucht. Figur 12 stellt Ergebnisse dar, die zeigen, dass die Bildung eines Komplexes stattfindet, der NALP1, Pycard, Caspase-1 und Caspase-5 enthält, das sogenannte Inflammosom. 25 Hierbei beruhen die in Figur 12a dargestellten Ergebnisse auf folgenden Versuchsansätzen: THP1-Zellysate wurden für die Dauer von 60 min bei 30°C inkubiert; diese Bedingungen führten zu spontaner Aktivierung von pro-IL1 $\beta$  (s. Figur 11b). Hierzu wurden Zellextrakte 30 größenfraktioniert auf Superdex S-200 Säulen. Das Elutionsmuster von NALP1, Pycard und Capase-1 in den Zellextrakten vor und nach der Aktivierung, d.h. nicht stimuliert und stimuliert, ist dargestellt. Die weißen Pfeile geben die Elutionspositionen der Proteine, die zu 35 einem Komplex von höherem Molekulargewicht hin verschoben

sind an (Inflammosom-Fraktionen 19 und 20). In der Kopfzeile von Figur 12a ist der Standard wiedergegeben (in kDa), also die Positionierung entsprechend großer Proteine in den einzelnen Fraktionen. Die verschiedenen Bildausschnitte geben die Elutionsprofile für NALP1, Pycard, Caspase-1 und FADD (letzteres zu Vergleichszwecken) wieder. Figur 12a zeigt, dass NALP1 (mit einem theoretischen Molekulargewicht von 156kDa) bereits ohne Stimulierung als Multiproteinkomplex vorliegt (ca. 700 kDa). Nach Auslösung der Caspase-1-Aktivierung kann eine deutliche Verschiebung des NALP1-Komplexes zu einem höheren Molekulargewicht (ca. 700 kDa) beobachtet werden. Auch Pycard und Caspase-1, die im nicht-stimulierten Zustand erwartungsgemäß bei ca. 30 kDa bzw. 60 kDa eluieren, werden nach Stimulation zumindest tw. auch in der 700 kDa-Fraktion, enthaltend NALP1, beobachtet. NALP1, Pycard und die beiden Caspasen Caspase-1 und Caspase-5 bilden das Inflammosom.

Figur 12b zeigt, daß NALP1, Pycard, Caspase-1 und Caspase-5 einen Komplex bilden, und zwar zeitabhängig. Hierbei wurden Extrakte von THP1-Zellen für verschiedene Zeiträume, wie in der Kopfzeile von Figur 12b wiedergegeben, stimuliert, indem bei 30°C inkubiert wurde. Die Immunopräzipitation erfolgte durch anti-Pycard-Antikörper (linke Auftragung) oder anti-NALP1-Antikörper (rechte Auftragung). Es wurde dann mit Hilfe der in Figur 12b jeweils dargestellten Antikörper im Western Blot die Anwesenheit von Caspase-1, Caspase-5 bzw. NALP1 untersucht. Wiederum sind rechts von den dargestellten Bildausschnitten die Positionen der dort zu erwartenden Proteine oder Proteinfragmente dargestellt (s.o.). Im Ergebnis coimmunopräzipitiert Caspase-1 entweder mit Pycard oder mit NALP1 in THP1-Zellextrakten in aktivierungsabhängiger Weise. Im Unterschied zum Zellextrakt lag im Immunopräzipitat im wesentlichen die

prozessierte (aktivierte) Form von Caspase-1 vor. Die Caspase-1-Bindung ist transient, da 2h nach der Stimulierung deutlich weniger Caspase-1 im Inflammosom nachweisbar war. Neben Caspase-1 immunopräzipitieren  
5 anti-Pycard-Antikörper auch die Caspase-5 und NALP1 abhängig von der Stimulation.

Figur 13 gibt Ergebnisse wieder, die zeigen, daß Pycard (und NALP1) für die Caspase-1- und Caspase-5-Aktivierung  
10 in THP1-Zellen unerlässlich ist. Hierzu wurden gemäß Figur 13a THP1-Zellysate bei 30°C für verschiedene Zeiträume und in Anwesenheit oder Abwesenheit von gegen beispielsweise Pycard oder NALP1 gerichteten Antikörpern und weiteren Kontroll-Antikörpern (MLTparacaspase,  
15 TRAMP/DR3, RIP2) stimuliert. Die Aktivierung von Caspase-1 wurde dann, wie in Figur 11b, beschrieben weiterverfolgt. In den beiden Bildabschnitten der Figur 13a ist oben ein Western Blot mit anti-Caspase-1-Antikörpern und unten ein Western Blot mit anti-Caspase-  
20 5-Antikörpern zu sehen. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Zugabe von anti-Pycard-Antikörpern zu Zellextrakten die Caspase-1-Aktivierung sofort herunterreguliert, die anderen zur Kontrolle eingesetzten Antikörper hingegen keinen Effekt bewirken. Anti-Pycard- oder anti-NALP1-  
25 Antikörper bewirkten eine Inhibierung der Caspase-5-Aktivierung.

Figur 13b gibt die Dosisabhängigkeit der durch anti-Pycard-Antikörper erzielten Inhibition der Caspase-5  
30 Aktivierung wieder. Diese Antikörper in entsprechenden Konzentrationen führen dazu, daß das p20-Spaltprodukt von Caspase-5 nicht mehr im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektierbar ist. Der inhibitorische Effekt von anti-Pycard-Antikörpern war also dosisabhängig.

Die Ergebnisse in Figur 13c bestätigen, daß anti-Pycard-Antikörper nicht mit der Cytochrom c-vermittelten Caspase-9-Aktivierung interferiert (die experimentellen Bedingungen sind im Zusammenhang mit Figur 11 beschrieben). Das Caspase-9-Spaltprodukt p20 ist mit anti-Caspase-9-Antikörpern nämlich weiterhin detektierbar, es findet also keine Inhibition statt.

Figur 13d stellt die Ergebnisse von Versuchen dar, bei denen THP1-Zelle extrakte mit Protein G-adsorbierten, gegen Pycard oder NALP1 oder als Kontrolle Ig gerichteten Antikörpern inkubiert wurden. Nach der Entfernung der entsprechenden Kügelchen wurde der Immunniederschlag von Pycard und NALP1 durch Western-Blot-Analyse untersucht. Die Caspase-1-Aktivierung wurde dann durch eine Temperaturerhöhung von 0° auf 30°C hervorgerufen. Hierbei wird Caspase-9 nur aktiviert (also p20 vorhanden), wenn Cytochrom C den Proben hinzugegeben wird. Wenn Pycard durch Zugabe von entsprechenden Antikörpern aus dem Zellextrakt durch Fällung vor der Stimulierung entfernt wird, wurde die Caspase-1-Aktivierung vollständig blockiert. Trotz unvollständiger Fällung von NALP1 mit Hilfe entsprechender Antikörper wurde dennoch eine signifikante Reduktion der Caspase-1-Aktivierung beobachtet.

Figur 14 gibt die Inhibierung der pro-IL1 $\beta$  Prozessierung durch dominant negative Varianten von Pycard (DN) wieder. Gemäß Figur 14a wurden THP1-Zellen durch Verwendung eines retroviralen Vektors, der die Flag-markierte Pysin-Domäne (Aminosäuren 1 bis 94, ohne CARD-Domäne) von Pycard und ein Resistenz-Gen gegen Puromycin kodiert, infiziert. Dieses Konstrukt ohne CARD-Domäne bindet an NALP1, aber nicht an Caspase-1, ist also eine erfindungsgemäße Verbindung zur Blockade der NALP1/Pycard-induzierten Caspase-1-Aktivierung. Nach Selektion mit Puromycin

wurden stabil transfizierte Zellpopulationen im Hinblick auf ihre Expression von Flag-markierten Proteinen durch Western-Blot-Analyse untersucht (gemäß Figur 14a sind zwei verschiedene Populationen dargestellt). Gemäß Figur 5 14a erhaltene stabil transfizierte Zellen, die DN-Pycard exprimieren, wurden mit LPS (10 µg/ml) für die angegebenen Zeitabschnitte behandelt, und die Prozessierung von Caspase-1, Caspase-5 und pro-IL1β in den entsprechenden Zellüberständen (SN), wie in Figur 11d 10 beschrieben, bestimmt. In den linken Spuren wurde DN-Pycard hinzugegeben, in den rechten Spuren ein Mock-Vektor als Kontrolle.

In dem oberen Bildausschnitt von Figur 14b ist deutlich 15 erkennbar, daß prozessiertes IL1β\* in den angegebenen Stimulationszeiträumen nur dann auftritt, wenn entsprechende Mock-Konstrukte eingesetzt wurden, dagegen konnten nur ganz schwache Signale bei Anwesenheit von DN-Pycard beobachtet werden. Auch im Hinblick auf Caspase-1 20 und Caspase-5 sind die prozessierten Formen im Falle einer Zugabe von DN-Pycard nur in geringen Mengen nachweisbar, es findet also keine Aktivierung (Sekretion) der Caspasen-1 und -5 statt. Dagegen hatte die expression von DN-Pycard keine Wirkung auf die LPS-induzierte NF-kB- 25 Aktivierung oder die pro-IL1β-Synthese.

Die beigegefügt en Anlagenblätter A1 bis A9 ist Bestandteil der vorliegenden Offenbarung.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher charakterisiert:

#### 35 Ausführungsbeispiele

1. Ausführungsbeispiel

Um zu überprüfen, ob die PYD-Domänen - wie auch die Domänen DD, DED, CARD - die Eigenschaft haben, nur mit Mitgliedern innerhalb der eigenen Familie von "6-Helix-Bündel-Proteinen" zu interagieren, wurden Expressionsvektoren für PYD-Proteine hergestellt und mit Coimmunopräzipitations-Experimenten ihre Eignung zur Interaktion mit anderen Proteinen überprüft. Hierzu wurden Pycard-Konstrukte durch PCR-Techniken aus den folgenden IMAGE-EST-Klonen amplifiziert: AA528254(965955) und AI148558(1714818). Pycard wurde mit den folgenden Primern amplifiziert: JT1509 5'-ATGGGGCGCGCGCGAC-3' und JT1512 5'-TCAGCTCCGCTCCAGG-3'. Die PYD-Domäne von Pycard wurde mit JT1509 und JT1510 5'-CGACTGAGGAGGGGCC-3' amplifiziert.

NALP1-Konstrukte wurden mit PCR-Methoden amplifiziert, indem die KIAA0926-EST-Klone aus dem Kazusa-DNA-Research Institut als "Template" verwendet wurden. NALP1-PYD wurde mit JT1497 5'-ATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCTGGCCTGTTACTTG-3' und JT1525 5'-GATCCAGGGCATTAGCAC-3' amplifiziert. NALP1-CARD wurde mit JT1500 5'-GTTGATACTTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAG-3' und JT1527 5'-GATGAGACTCTGGTGTGG-3' amplifiziert.

Die amplifizierten Fragmente wurden in PCR-Zero-Blunt (von Invitrogen) ligiert und in der EcoR1-Schnittstelle von VSV oder Flag, die die PCR-3 (von Invitrogen) abgeleiteten Vektoren enthalten, subkloniert, wie bei Thome et al. (1999, J. Biol. Chem., 274, 9962-8) beschrieben. Die anderen eingesetzten Konstrukte wurden bereits vorher bei Thome et al. (1999 J. Biol. Chem., 274, 9962-8) beschrieben und sind in Hinblick auf die Darstellung der experimentellen Ausführung Bestandteil der vorliegenden Offenbarung. Die Veröffentlichung von Burns et al. (1998, J. Biol. Chem., 273, 12203-12209) beschreibt die Durchführung der Immunopräzipitation. Sie ist gleichfalls Bestandteil der vorliegenden Offenbarung und läßt sich zusammengefaßt so darstellen:



293T-Zellen, die in DMEM-Medium kultiviert wurden, das mit 10%igen fötalem Kälberserum Glutamin ergänzt wurde, wurden mit einer Dichte von  $1-3 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Platte angesetzt und mit 3µg des jeweiligen Konstrukts am nächsten Tag durch die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert. Die Zellen wurden gesammelt und in Lyse-Puffer 24 bis 26 Stunden nach der Transfektion lysiert (der Lysepuffer enthält 0,2% NP40, 150mM NaCl, 50mM EDTA, 30mM Tris, pH 7,4). Die Zell-Lysate wurden für mindestens drei Stunden auf Sepharose 6B (von Pharmacia) vor der Präzipitierung mit einer gleichen Menge von Proteinen bei 4°C für 4 Stunden mit 3µl einer Flag-Agarose (von Kodak International Biotechnology) von 3µl von Sepharose 6B Kügelchen vorgereinigt. Das Harz wurde sechsmal in Lysepuffer gewaschen und nach der letzten Wäsche wurde gebundenes Protein durch Kochen im Probenpuffer eluiert, separiert durch SDS-PAGE und auf Nitrocellulose transferiert (von Hybond ECL, Pharmacia), um nachfolgend das Western-Blotting durchführen zu können. Die anti-VSV und anti-Flag-Antikörper stammen von Sigma. Ein HRP-konjugierter Antikörper wurde eingesetzt, der spezifisch die schweren Ketten von murinem IgG1 (von Southern Biotechnology Associates) detektierte.

Wie in Fig. 4 als Ergebnis des vorliegenden Ausführungsbeispiels gezeigt, konnte eine spezifische Bindung von Pycard mit dem PYD-Domän von Pycard und NALP dann detektiert werden, wenn eine Coexpression mit VSV-markiertem Pycard, Flag-markierten Konstrukten, die entweder die PYD-Domäne von Pycard oder die PYD-Domäne von NALP1 enthalten coexprimiert wurden. Dagegen wurden keine Interaktion der PYD-Domäne von Pycard mit anderen PYD-Domänen oder mit Todesdomänen, CARD-Domänen oder Todeseffektordomänen (letzteres ist in Fig. 4 nicht dargestellt)

festgestellt. Daher interagiert eine PYD-Domäne spezifisch mit PYD-Domänen über eine Protein-Protein-Wechselwirkung. Im Ergebnis zeigt Fig. 4 also, daß Pycard mit Hilfe seiner PYD-Domäne homodimerisiert und mit der PYD-Domäne von NALP1 interagiert.

## 2. Ausführungsbeispiel

NALP1 Cter (AS 1030 bis 1430, der NAD- und der CARD-Domäne entsprechend), wurde mit Hilfe von JT1658 (5'-aaactcctggacgtgagcaag-3') und JT1500 (5'-tcagctgagtggcaggag-3') amplifiziert und in dem Säugerexpressionsvektor pCR3 im entsprechenden Leseraster mit der "tag"-Markierung subkloniert. In ähnlicher Weise wurde NALP1 Nter (AS 1 bis 665, entsprechend der Pyrin- und der NBS-Domäne) mit Hilfe der Primer JT1497 (5'-atggctggcggagcctggggc-3') und JT1526 (5'-caggcctagtattccata-3') amplifiziert. Die Expressionskonstrukte für Caspase-4, Caspase-1, und Caspase-9, Flag-markiertem RIP2, Apaf1, RAIDD, Bcl10, IL-1 $\beta$ , wurden entsprechend der Beschreibung bei Thome et al. (Current Biology 8, 885 (1998) und Thome et al. (J. Biol. Chem. 274, 9962 bis 9968 (1999)) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide, die für Caspase-5 und NOD1 kodieren, stammen von Christoph Fröhlich bzw. Gabriel Nunez (Department of Pathology, Univ. of Michigan Med School, 1500 E. Medical Center, Ann Arbor, MI 48109, USA). Transiente Transfektion von 293T-Zellen, die Zellyse, die Immunopräzipitationsanalyse, das "Immunoblotting" und der NF- $\kappa$ B-Assay wurden so durchgeführt wie bei Thome et al. (Current Biology 8, 885 (1998)) beschrieben, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird und was in die Offenbarung referenziell eingeschlossen ist. Die vorgenannten Verfahren wurden wie an vorzitiertem Stelle beschrieben, durchgeführt, abgesehen von der Verwendung

von Ig schwerkettenspezifischen Antikörpern (HRP-konjugierten Ziegen-anti-Maus IgG1 und Ziegen-anti-Kaninchen IgG als Sekundärreagenz im Rahmen des "Western-Blottings" (Southern Biotechnology, Birmingham, GB).

5

Polyklonale Antikörper wurden durch Injektion von MAP-Peptiden, die den Aminosäuren 2 bis 25 von NALP1, den Aminosäuren 2 bis 27 von Pycard entsprechen in Kaninchen (Eurogentec, Belgien) und nachfolgender Immunoreinigung auf den entsprechenden Peptiden hergestellt. Der monoklonale Antikörper, gerichtet gegen die CARD-Domäne von Caspase-1, stammt von Junying Yuan (Boston, MA 02115, USA, Harvard Medical School, 240 Longwood Av.)

10

Die weiteren Antikörper wurden von den folgenden Herstellern erworben: Caspase-5 (MBL), Caspase-9, PARP, gespaltenes IL-1 $\beta$  D116 (Cell Signaling), Anti-Flag-Antikörper (M2, Sigma), Anti-VSV-Antikörper (P5D4, Sigma), Caspase-3 (Transduction Laboratories).

20

Zur in-vitro Caspase-1/pro-IL1 $\beta$ -Aktivierung wurden THP.1 Zellen in Suspension in entsprechenden Flaschen in RPMI 1640 Medium, ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum, 50 $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol und Penicillin/Streptomycin (jeweils 100  $\mu$ g/ml) bis zu einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml aufgezogen und für eine Stunde mit LPS (1  $\mu$ g/ml) prästimuliert. Zytosolische Extrakte wurden, wie bei Liu et al. (Cell 86, 147 - 157, 1996) beschrieben, hergestellt. Zusammenfassend läßt sich hierzu sagen, daß die Zellen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen wurden, in 5 Volumina eisgekühltem hypotonischen Puffer W (20 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Na EDTA, 1 mM Na EGTA, und 0,1 mM PMSF) unter Hinzufügung eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Roche, Basel, CH) aufquellen

30

35

konnten. Nach einer 15 min. Eiskühlung wurden die Zellen durch 15-malige Passage durch eine G22-Nadel aufgebrochen. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände filtriert (0,45µ) und für den in-vitro IL-1β Spaltungsassay verwendet.

Die Immunopräzipitation von endogenem Caspase-1/NALP1, Pycard-Interaktionskomplex wurde unter Zuhilfenahme von  $5 \times 10^8$  THP.1 Zellen pro Zeitpunkt durchgeführt. Die in-vitro Inflammosom-Aktivierung wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Mit 3 µg des indizierten Antikörpers bei 4°C im Puffer W, mit 20 µl Protein-A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) für 4 Stunden, wurde immunopräzipitiert. Die Komplexe wurden durch Zentrifugation wiedergewonnen und 6mal mit dem Puffer W gewaschen. Um Pyrin und NALP1 immunologisch niederzuschlagen, wurden THP.1-Zellextrakte mit auf Protein-G-Kügelchen adsorbierten Antikörpern für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach Entfernung der Kügelchen wurde die Caspase-1-Aktivierung durch Temperaturerhöhung auf 30°C angestoßen.

Die aktivierten Proben (inkubiert bei 30°C) oder die nicht-aktivierten Proben (bei 4°C belassen, Kontrollproben) wurden auf Superdex-200 HR 10/30 Säulen geladen und die Proteine wurden im Puffer W bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, als 0,5 ml Fraktionen, eluiert. Das "Western-Blotting" wurde nach Chloroform:Methanol-Präzipitierung der Gesamtfraktion durchgeführt. Die Säule wurde mit den folgenden Proteinen als Standard kalibriert: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinderserum-Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa).

Um eine LPS-Aktivierung der Caspase-1/Pro-IL-1 $\beta$ -Aktivierung zu erreichen, wurden THP.1-Zellen mit 0,5  $\mu$ M PMA (Calbiochem) für die Dauer von 3 Stunden differenziert. Die Zellen wurden gewaschen und auf 24 "Well"-Platten bei einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro "Well" ausplattiert und dort belassen, um über Nacht sich anheften zu können. Nach dem Waschen im Medium ohne FCS, wurden die Zellen mit LPS 10 $\mu$ g/ml (E.coli 055:B5, Sigma), wie in Fig. 11 gezeigt, behandelt oder nicht behandelt. Die Zellüberstände und Zellsiederschläge wurden entnommen und durch "Western-Blotting" hinsichtlich verschiedener Caspasen und IL-1 $\beta$  analysiert.

Um stabile Zelllinien herzustellen, wurden Flag-markierte dominant negative (DN) Formen von Pycard (AS 1 bis 94, entsprechend der Pyrin-Domäne) in MSCV Puromycin-selektierbare retrovirale Vektoren (Clontech) kloniert und ein rekombinantes Virus wurde erhalten und nach Transfektion von 293T-Zellen in Kombination mit einem Vektor, enthaltend die viralen Strukturgene (VSV-G "Pseudotyping" Vektor), titriert. THP.1-Zellen wurden infiziert, mit Puromycin (5  $\mu$ g/ml) für die Dauer von 2 Wochen selektiert und die Zellpopulationen wurden auf die Proteinexpression, Caspase-1, Caspase-8 und IL-1 $\beta$ -Aktivierung hin analysiert.

**Anlagen A1 bis A9**

5

A1:

In pro-apoptotischen Signaltransduktionskaskaden wird die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Initiatoreinheiten, wie z.B. dem Todesrezeptor Fas, den  
10 verschiedenen Adaptorproteinen und den Caspasen in erster Linie durch drei strukturell verwandte Protein-Protein-Domänen, nämlich der Todesdomäne (DD), Todeseffektordomäne (DED) und der Caspaserekrutierungsdomäne (CARD), vermittelt. Im vorliegenden Fall wird der Nachweis erbracht, dass eine vierte verwandte Domäne, die Pyri-  
15 domäne (PYD) genannt, existiert. Die PYD wird in Pyrin, einem Protein, das bei Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber mutiert ist, bei Pycard, einem Regulator der Etoposid-vermittelten Apoptose, bei einer Caspase vom Zebrafisch und in zwei neuen Proteinen (NALP1, NALP2), die strukturell mit dem Apoptose-Regulationsprotein Card4/Nod1 verwandt sind, beobachtet. Für die PYD-Domäne von Pycard wurde nachgewiesen, dass sie homodimerisiert und mit PYD von NALP1  
20 interagiert. Die Identifizierung der PYD-Familienmitglieder kann hierbei zur kurzfristigen Charakterisierung von pro-apoptotischen und/oder pro-inflammatorischen Signaltransduktionswegen beitragen.

**Einführung**

25 Die Apoptose oder der programmierte Zelltod ist ein wesentlicher Vorgang bei Tieren und Pflanzen, insbesondere für die Beseitigung von unerwünschten Zellen in einer geordneten Art und Weise. Während der letzten Jahre ist ein erheblicher Fortschritt bei der Identifizierung und Charakterisierung der modularen Natur von Molekülen, die für die Regulation und Exekution der Apoptose verantwortlich sind, erzielt worden  
30 (Aravind et al., 1999, Hofmann, 1999). Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass drei Familien von Homologiedomänen, die Todesdomäne (DD), die Todeseffektordomäne (DED) und die Caspaserekrutierungsdomäne (CARD) existieren, die entfernt miteinander verwandt sind, und eine Superfamilie von „Sechs-Helix-bundle“-Proteininteraktionsdomänen bilden. Bei diesen Domänen ist insbesondere wichtig, dass  
35 sie hochspezifische Wechselwirkung mit Mitgliedern der gleichen Subfamilie ausüben und in den meisten Fällen auch eine Rolle beim Signaltransduktionsprozess, der zur

Apoptose und/oder Entzündung führt, spielen. Im Besonderen ist zu beachten, dass die „Adaptorebene“ von Proteinen, die nämlich die Todesrezeptorsignale zu den Caspasen transportieren, stark mit Proteinen besetzt ist, die Kombinationen von Domänen von DD/DED/CARD aufweisen. Aufgrund der großen Bedeutung und der Vorhersagbarkeit ihrer Funktion sind mehrere systematische Suchen nach neuen Proteinen, die diese Domänen enthalten, erfolgreich durchgeführt worden. Hierdurch wurde die Entdeckung von Proteinen wie FLIP, CARDIAK/RIP2, ARC, Bcl10, DEDD (Irmeler et al., 1997; Koseki et al., 1998; McCarthy et al., 1998; Stegh et al., 1998, Thome et al., 1999) möglich. Im folgenden berichten wir von der Entdeckung einer neuen Domänenart, die im folgenden PYD (Pyrindomäne) genannt wird. Diese kann als vierte Subfamilie innerhalb der „Sechs-Helix-„bundle“-Interaktionsdomänen“ bezeichnet werden, nämlich aufgrund von Sequenzhomologien, Strukturvorhersage und Interaktionseigenschaften.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### Identifizierung einer neuen Domäne: Die Pyrin-Domäne

Im Zuge der Analyse der Sequenz des kürzlich identifizierten Proteins Pycard mit einer CARD-Domäne (PYD und CARD enthaltendes Protein), das auch als ASC („Apoptose-assoziiertes Speckle-ähnliches Protein“) bekannt ist, wurde realisiert, dass die zweite strukturelle Domäne, die am N-Terminus von Pycard (Pyrindomäne, PYD) auftritt, eine schwache, aber signifikante Sequenzhomologie zu einer Vielzahl anderer Proteine (Figur 1A) aufweist. Pycard ist ein 22-kDa-Protein, das Aggregate bildet, sobald die Apoptose durch gewisse Antitumorsubstanzen induziert wird (Masumoto et al., 1999).

Darüber hinaus ist festzustellen, dass bei Zellen, die dazu gezwungen wurden, reduzierte Mengen von Pycard zu exprimieren, die Etoposid-vermittelte Apoptose gleichfalls signifikant unterdrückt ist. Unter Verwendung von PYD von Pycard ergab eine einfache BLAST-Suche, dass zwei zusätzliche PYD-enthaltende Proteine in der Sequenzdatenbank enthalten sind, nämlich Pyrin und Caspy. Pyrin wurde anfänglich als Produkt des MEFV (Mittelmeerfieber)-Gens identifiziert, das bei Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber mutiert ist (FrenchFMFConsortium, 1997;

InternationalFMFConsortium, 1997), ein erbliches periodisches Fiebersyndrom, das durch episodisches Fieber und serosale und synoviale Entzündung charakterisiert ist. Der Erkenntnisstand im Hinblick auf Pyrin basiert im wesentlichen auf seiner Domänenstruktur, die, zusätzlich zur PYD-Domäne, auch einen B-Box-Zinkfinger und eine „Spry“-Domäne aufweist (Figur 1B). Es wurde daher vorgeschlagen, dass Pyrin ein Mitglied der RoRet-Genfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren ist, was Anlaß zur Spekulation gab, dass das Protein als ein transkriptionaler Inflamationsregulator (Centola et al., 1998) fungiert. Neuere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass Pyrin in Zytoplasma lokalisiert ist und keine nachweisbare transkriptionale Aktivität aufweist (Chen et al., 2000; Tidow et al., 2000). Daher ist die genaue Funktion von Pyrin bei inflammatorischen Krankheiten immer noch ungeklärt.

Auf der Basis der PYD-Sequenz dieser beiden Proteine wurde ein allgemeines PYD-Profil erstellt (Bucher et al., 1996) und in den nachfolgenden Suchschritten in der EST-Datenbank eingesetzt. Zwei zusätzliche PYD-enhaltende Proteine NALP1 und NALP2 (NACHT; LRR und PYD-enhaltende Proteine) wurden identifiziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass die NALPs eine PYD-, NACHT- und LRR-modulare Organisation aufweisen (Figur 1A, B). Die NACHT- und LRR-Domänenarchitektur wird bei Proteinen aufgefunden, die an der Inflammation oder Apoptose beteiligt sind, insbesondere bei CARD4/Nod1 (Figur 1B), ein NF- $\kappa$ B-induzierendes Molekül (Bertin et al., 1999; Inohara et al., 1999), einem neuronalen Apoptose-Inhibitor-Protein, NAIP, und dem MHC Klasse II-Transkriptionsaktivator, CIITA (Koonin und Aravind, 2000). Interessanterweise ist die Domäne PYD von NALP2 durch CARD bei CARD4/Nod1 ausgetauscht, während die strukturelle Gesamtorganisation konserviert ist, was eine ähnliche Funktionalität vermuten lässt (Figur 1B). CASPY ist ein PYD- und Caspasedomäne enthaltendes Protein, das anfänglich mit einer Datenbanksuche nach Zebrafisch-Homologen von Apoptoseregulatoren von Säugern (Inohara und Nunez, 2000) identifiziert wurde. Diese Caspase ist am stärksten homolog zur Caspase-13, die beim Menschen CARD anstelle von PYD enthält. Beachtenswert ist, dass die gleiche Untersuchung ein Pycard-verwandtes Protein bei Zebrafischen identifiziert hat, was eine hohe evolutionäre Konservierung dieser Proteine indiziert (Figur 1A).



### Die Pyrin-Domäne ist verwandt mit der DD-Familie

Auf der Basis von Sequenzvergleichen wurde vorgeschlagen, dass die Domänen DD, DED und CARD strukturell verwandte Protein-Proteininteraktionsmodule darstellen (Hofmann et al., 1997). Alle drei Domänenarten haben eine ähnliche Größe und die Sekundärstruktur-analyse ergab eine ähnliche Anordnung der sechs  $\alpha$ -Helices. Alle drei Domänen teilen also die Eigenschaft, Homo- oder Heterodimere bilden zu können, und sind außerdem hochkonserviert (Hofmann et al., 1997). Die Strukturvorhersage wurde später durch NMR-Analyse der DDs, DEDs und CARDS (Chou et al., 1998; Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996; Zhou et al., 1999) bestätigt, da die strukturelle Topologie dieser Domänen sich als sehr ähnlich erwies, insbesondere im Hinblick auf den strukturellen Kern, der durch die Helices  $\alpha 2$  bis  $\alpha 5$  gebildet wird (Figur 2). Einschließlich der PYD-enthaltenden Sequenzen in einem allgemeinen „Alignment“ gegenüber DED, CARD und DD, wurde erfindungsgemäß die PYD-Domäne als ein potentiell viertes Glied der „DD-gefalteten“ Superfamilie identifiziert (Figur 2).

Trotz der Ähnlichkeit ihrer Faltung ist bekannt, dass DD, DED und CARD ausschließlich, mit Mitgliedern der eigenen Subfamilie interagieren, so dass keine Promiskuität zwischen den Domänen festgestellt werden konnte. Um zu überprüfen, ob die PYDs die gleichen Eigenschaften aufweisen, wurden Expressionsvektoren für die PYD-Proteine erzeugt, und in Ko-Immunopräzipitationsexperimenten auf ihre Eigenschaft, mit anderen Proteinen zu interagieren, getestet. Wie in Figur 3 dargestellt, wurde eine spezifische Bindung von Pycard mit den PYDs von Pycard und NALP1 detektiert, wenn eine Koexpression mit einem VSV-markierten Pycard, Flag-markierten Konstrukten enthaltend die PYD von Pycard oder die PYD von NALP1 ausgeführt wurde. Keine Interaktionen der PYD von Pycard mit anderen PYDs oder mit DDs, CARDS oder DEDs (Figur 3) wurden nachgewiesen. Daher ist die PYD-Domäne eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die spezifisch mit PYD-Domänen interagiert.

Pycard mit seiner PYD-CARD zweigeteilten Domänenorganisation erinnert an das DD und DED enthaltende Molekül FADD oder das DD und CARD enthaltende Protein RAIDD. Für beide Proteine ist bekannt, dass sie ein DD enthaltendes Protein mit einem

eine DED- oder CARD-Domäne enthaltenden Protein adaptieren. Beispielsweise erfordert die DD von Fas FADD, um an die DED von Caspase-8 zu binden. Unsere Resultate lassen vermuten, dass Pycard ein neues Adaptormolekül darstellt, das NALP1 an ein noch unbekanntes und zu definierendes CARD-enthaltendes Protein koppelt. Tatsächlich zeigen erste Resultate, dass die CARD von Caspase-5 die Zielstruktur von Pycard-CARD ist. Die physiologische Rolle dieser Interaktion wird zur Zeit noch untersucht.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass wir PYD als ein neues Protein-Protein-Interaktionsmodul identifiziert haben, das alle Kriterien eines Mitglieds der DD-Faltungsfamilie erfüllt. Vergleichbar zur beschränkten Interaktions-Fähigkeit, die für andere Mitglieder gilt, interagieren PYDs nur mit PYDs und nicht mit Mitgliedern der drei anderen Subfamilien. Darüber hinaus werden PYDs im Zusammenhang mit Proteinen, die an der Apoptose und der Inflammation beteiligt sind, gefunden, was am besten durch die Caspase Caspy belegt ist. Regelmäßig treten PYDs zusammen mit CARDs, wie z.B. bei NALP1 und Pycard, auf. Die Identifizierung der neuen, PYD-enthaltenden Proteine ermöglicht daher wahrscheinlich die Charakterisierung von neuen pro-apoptotischen oder pro-inflammatorischen Signaltransduktionswegen, wie es auch der Fall war nach der Identifizierung der DD von Fas vor einigen Jahren (Itoh und Nagata, 1993). Wir glauben, dass die Charakterisierung von NALP1 und dem Pycard-Komplex bereits der erste Schritt in diese Richtung ist, was schließlich zu einem besseren Verständnis der molekularen Ursachen von inflammatorischen Krankheiten führen wird.

## METHODEN

### Sequenz- und Strukturanalyse

Die Blast- und Profile-Algorithmen wurden verwendet (Bucher et al., 1996), die auf dem ISREC-Server ([www.isrec.isb-sib.ch](http://www.isrec.isb-sib.ch)) verfügbar sind. Die Sekundärstruktur wurde nach den Algorithmen von Rost und Sander (1993) vorhergesagt.

### Klonierung, Expression und Immunopräzipitation

Pycard-Konstrukte wurden durch PCR aus den folgenden IMAGE EST-Klonen  
5 amplifiziert:

AA528254 (965955) und AI148558 (1714818). Pycard wurde amplifiziert mit den  
folgenden Primern: JT1509 5'-ATGGGGCGCGCGCGCGAC-3' und JT1512 5'-  
TCAGCTCCGCTCCAGG-3'. Die PYD-Domäne von Pycard wurde amplifiziert mit  
10 JT1509 und JT1510 5'-CGACTGAGGAGGGGCC-3'.

NALP1-Konstrukte wurden amplifiziert durch PCR unter Verwendung des KIAA0926  
EST-Klons aus dem Kazusa DNA Forschungsinstitut als „Template“. NALP1-PYD  
wurde amplifiziert mit JT1497 5'-  
15 ATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCCTGGCCTGTTACTTG-3' und JT1525 5'-  
GATCCAGGGCATTAGCAC-3', NALP1-CARD wurde amplifiziert mit JT1500 5'-  
GTTGATACTTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAG-3' und JT1527 5'-  
GATGAGACTCTGGTGTGG-3'.

20 Amplifizierte Schnitt-Fragmente wurden in PCR-Zero-Blunt (Invitrogen) ligiert und  
anschließend in die EcoR1-Schnittstelle von VSV oder Flag-enthaltenden PCR-3  
(Invitrogen) abgeleiteten Vektoren (Thome et al., 1999) subkloniert. Andere  
Konstrukte, die verwendet wurden, entsprachen jenen, die bereits zuvor beschrieben  
worden sind (Thome et al., 1999) subkloniert.

25

Die Immunopräzipitierung wurde, wie zuvor beschrieben (Burns et al., 1998),  
durchgeführt. Kurz zusammengefasst, 293 T-Zellen wurden in DMEM-Medium, das  
mit 10%igem fötalen Kälberserumglutamin angereichert war, kultiviert, in einem  
Bereich von  $1-3 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Platte ausgesetzt und mit 3 µg der indizierten  
30 Konstrukte am nächsten Tag durch die Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode  
transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und in Lysepuffer lysiert (0,2% NP40, 150 mM  
NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,4) 24-26 Stunden nach der Transfektion. Die  
Zell-Lysate wurden für mindestens 3 Stunden auf Sepharose 6B (Pharmacia)

vorgereinigt, und zwar vor der Fällung von einer gleichen Menge von Proteinen bei 4°C für vier Stunden mit 3 µl von Flag-Agarose (Kodak International Biotechnology) und 3 µl von Sepharose 6B-Perlen. Das Resin wurde 6x in Lysepuffer gewaschen und nach  
5 dem letzten Waschschrift wurden die gebundenen Proteine durch Kochen in Probenpuffer eluiert, durch SDS-Page separiert und auf Nitrocellulose (Hybond ECL, Pharmacia) für das nachfolgende Western-Blotting transferiert. Sowohl Anti-VSV- und Anti-Flag-Antikörper wurden von Sigma gekauft. Ein HRP-konjugierter Antikörper, der spezifisch die schwere Kette von IgG1 der Maus (Southern Biotechnology Associates)  
10 detektieren konnte, wurde eingesetzt.

## Referenzen

- Aravind, L., Dixit, V.M. and Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *TIBS*, 24, 47-53.
- Bertin, J., Nir, W.J., Fischer, C.M., Tayber, O.V., Errada, P.R., Grant, J.R., Keilty, J.J., Gosselin, M.L., Robison, K.E., Wong, G.H., Glucksmann, M.A. and DiStefano, P.S. (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 274, 12955-8.
- Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N. and Hofmann, K. (1996) A flexible search technique based on generalized profiles. *Computer Chem.*, 20, 3-24.
- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di Marco, F., French, L. and Tschopp, J. (1998) MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.*, 273, 12203-12209.
- Centola, M., Aksentijevich, I. and Kastner, D.L. (1998) The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1581-8.
- Chen, X., Bykhovskaya, Y., Tidow, N., Hamon, M., Bercovitz, Z., Spirina, O. and Fischel-Ghodsian, N. (2000) The familial mediterranean fever protein interacts and colocalizes with a putative Golgi transporter. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 224, 32-40.
- Chou, J.J., Matsuo, H., Duan, H. and Wagner, G. (1998) Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell*, 94, 171-80.

- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S.C., Zheng, L., Lenardo, M.J. and Fesik, S.W. (1998) NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, 392, 941-5.
- FrenchFMFConsortium. (1997) A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. *Nat. Genet.*, 17, 25-31.
- Hofmann, K. (1999) The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 55, 1113-28.
- Hofmann, K., Bucher, P. and Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 155-156.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. and Fesik, S.W. (1996) NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, 384, 638-41.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J. and Nunez, G. (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 274, 14560-7.
- Inohara, N. and Nunez, G. (2000) Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ*, 7, 509-10.
- InternationalFMFConsortium. (1997) Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell*, 90, 797-807.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and

- Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-195.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.*, 268, 10932-7.
- Koonin, E.V. and Aravind, L. (2000) The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *TIBS*, 25, 223-4.
- Koseki, T., Inohara, N., Chen, S. and Nunez, G. (1998) ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5156-60.
- Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T. and Sagara, J. (1999) ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 33835-8.
- McCarthy, J.V., Ni, J. and Dixit, V.M. (1998) RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.*, 273, 16968-16975.
- Rost, B. and Sander, C. (1993) Secondary structure prediction of all-helical proteins in two states. *Protein Eng.*, 6, 831-6.
- Stegh, A.H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhansel, C., Hofmann, T.G., Grummt, I., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J.*, 17, 5974-86.

- Thome, M., Martinon, F., Hofmann, K., Rubio, V., Steiner, V., Schneider, P., Mattmann, C. and Tschopp, J. (1999) Equine herpesvirus-2 E10 gene product, but not its cellular homologue, activates NF-kappaB transcription factor and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*, 274, 9962-8.
- Tidow, N., Chen, X., Muller, C., Kawano, S., Gombart, A.F., Fischel-Ghodsian, N. and Koeffler, H.P. (2000) Hematopoietic-specific expression of MEFV, the gene mutated in familial Mediterranean fever, and subcellular localization of its corresponding protein, pyrin. *Blood*, 95, 1451-5.
- Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J. and Wagner, G. (1999) Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11265-70.



**FIGURLEGENDEN**

**Fig. 5 (A)** Multiple Ausrichtung (Alignment) der Pyrin-Domäne. Position mit mehr als  
 5 50% identischen oder ähnlichen Aminosäuren sind auf schwarzem bzw. grauem  
 Hintergrund dargestellt. Die Speziesabkürzung ist wie folgt: HS, Homo sapiens und  
 DR, Danio rerio. Genebank/EMBL Zugangsnummern sind: AF310103 für humanes  
 Pycard, AF310104 für murines Pycard, O15553 für Pyrin, AF310105 für NALP1;  
 AF310106 für NALP2, AAF66964 für Zebrafisch CASPY, AAF66956 für Zebrafisch  
 10 Pycard. **(B)** Domänenstruktur der Proteine, die eine Pyrin-Domäne enthalten.  
 Homologie-Domänen werden wie folgt benannt: PYD für Pyrin-Domäne, CARD für  
 Caspase Recruitment Domain; NACHT für NAIP, CIITA, HET-E und TP1-Domäne;  
 LRR für Leucine-Rich Repeats, SPRY für Domäne beim SPla und Ryanodine-  
 Rezeptor. B für B-Box. **(C)** Aminosäuresequenz von NALP1. Die verschiedenen  
 15 Schattierungen der Boxen entsprechen den Domänen wie in Figur 1B (4B) gezeigt.

**Fig. 6** Ausrichtung der repräsentativen Pyrin-Domänen (PYD), Todeseffektordomänen  
 (DED), Caspaserekrutierungsdomänen (CARD) und Todesdomänen (DD); diese zeigt  
 die Ähnlichkeit dieser Interaktionsdomänen.  $\alpha$ -Linien indizieren die vorhergesagten  $\alpha$ -  
 20 Helices für PYD (Rost und Sander, 1993) und die indizierten  $\alpha$ -Helices bei den DD-,  
 CARD-, bzw. DED-Lösungsstrukturen (Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996; Zhou  
 et al., 1999)

**Fig. 4** Pycard homodimerisiert mit Hilfe seiner PYD und interagiert mit PYD von  
 25 NALP1. Flag-markierte Konstrukte enthalten: PYD von Pycard (Pycard-PYD), RAIDD,  
 CARD von Apaf-1 (Apaf1-CARD), PYD von NALP1 (NALP1-PYD), CARD von  
 NALP1 (NALP1-CARD) und ein leerer Vektor (Mock-Vektor) wurden in 293 T-Zellen  
 mit einem VSV-markierten Pycard-Konstrukt-kotransfiziert. Die Zellen wurden 24  
 Stunden nach Transfektion lysiert und die Anti-Flag-Immunopräzipitate wurden im  
 30 Hinblick auf die Gegenwart von einem VSV-Pycard analysiert. Die Expression der  
 verschiedenen Konstrukte wurde in den Zell-Lysaten (untere Darstellung) analysiert.

**Ansprüche**

5

1. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein mit mindestens einer PYD-Domäne codiert, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Fragmente oder Allele.

10

2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich ein Signifikanzniveau von  $p < 10^{-2}$  ergibt, wenn die PYD-Domäne der DNA-Sequenz mit einem Suchprofil nach Figur 3 verglichen wird.

15

3. DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß deren Genprodukt eine der Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), wie in Figur 6 wiedergegeben, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Allele oder Fragmente, enthält.

20

4. DNA-Sequenz nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine der in Figur 1 angegebenen (c)DNA-Sequenzen enthält.

25

5. DNA-Sequenz nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß deren Genprodukt eine der in Figur 1 angegebenen Aminosäuresequenzen enthält.

30

6. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.

35

7. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert ist.

8. Wirtszelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Säugetierzelle, insbesondere eine humane Zelle, ist.

9. Aufgereinigtes Genprodukt, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 codiert wird.

10. Aufgereinigtes Genprodukt nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polypeptid ist.

11. Aufgereinigtes Genprodukt nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß es eine der in Figur 7 angegebenen Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), einschließlich aller funktionshomologen Allele, Fragmente oder Derivate enthält.

12. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Epitop auf einem Genprodukt nach einem der Ansprüche 9 bis 11 erkennt.

13. Antikörper nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.

14. Antikörper nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen einen Sequenzabschnitt auf der PYD-Domäne als Epitop gerichtet ist.

15. Verfahren zur Isolierung von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen nach Anspruch 7 oder 8 unter geeigneten, die Expression fördernden Bedingungen kultiviert werden und das Genprodukt schließlich aus der Kultur aufgereinigt wird.
16. Verfahren zur Expression von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert werden.
17. Verwendung einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines Genprodukts nach einem der Ansprüche 9 bis 11 zur Behandlung von Erkrankungen, die auf fehlgesteuerter intrazellulärer Signaltransduktion beruhen.
18. Verwendung einer DNA-Sequenz oder eines Genprodukts nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung um eine solche mit einer überschießenden Entzündungsreaktion handelt.
19. Verwendung einer DNA-Sequenz oder eines Genprodukts nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung um Psoriasis, Artherosklerose, bakterielle oder virale Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma, Sarkoidose, glomeruläre Nephritis oder Osteoarthritis handelt.
20. Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß sie die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung blockiert.

21. Verbindung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine organisch-chemische Verbindung mit einem Molekulargewicht von vorzugsweise < 3000 ist.

5 22. Verbindung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Zellmembran durch Diffusion oder über membranöse Transportproteine passiert.

10 23. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 20 oder 21 zur Behandlung von (bzw. zur Herstellung eines Arneimittels zur Behandlung von) Psoriasis, Artheriosklerose, bakterielle oder virale  
15 Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma, Sarkoidose, glomeruläre Nephritis oder Osteoarthritis.

20

25

Fig. 1

1.1

.....

>Pyc.hs  
MGTKREAILKVLENLTPEELKKFKMKLGTVPLREGFERIPRGALGQLD  
IVDLTDKLVASYEDYAELVVAVLDRMRMLEEAARLQRAA

>Pyc.cdna  
AGGAAAGGTAGGACCTGATGGCTCCAGGCCCTCGGAGGCTCAGAGGCGCAG  
GGCTGAGCCATGGGAACGAAGCGCGAGGCCATCCTGAAGGTGCTGGAGAAC  
CTGACACCGGAGGAGCTCAAGAAGTTCAAGATGAAGCTGGGGACGGTGCCG  
CTGCGCGAGGGCTTCGGGCGCATCCCGCGGGGCGCGCTCGGGCAGCTAGATA  
TCGTGGACCTCACCGACAAGCTGGTCGCCTCCTACTACGAGGACTACGCAGC  
CGAGCTCGTCGTGGCCGTGCTGCGCGACATGCGCATGTTGGAGGAGGCCGCA  
CGGCTGCAGCGGGCTGCGTGAGGGCCACTCTGAGCTGGAGGCGGGTCAAGG  
CAAAAGGAGTAATGCAACGCCTGTGAAGCCAGCCCCACGCGCGCACCAGTC  
GCGTAAGACAACAGCAGTGTCTCCACCTCGGGGACCAAGGACGCCTCCGTGC  
CTCCAGACCCCGCCTCCTCCAGCCCCTGCACCTGTCATTTATTCTTCCACTGCC  
CAATAAATATTCATGGCAGACTTTAAAAAAAAA

1.2

>Pyrin  
MAKTPSDHLLSTLEELVPYDFEFKFKLQNTSVQKEHSRIIPRSQIQRARFVKMATLLVTYYGEEYAVQLT  
LQVLRRAINQRLLAELHRAAIQEYSTQENGTDSDAASSSLGENKPRSLKTPDHPEGNEGNGPRPYGGGAA  
SLRCSQPEAGRGLSRKPLSKRREKASEGLDAQKPRTRSPALPGGRSPGPCRALEGGQAEVRLRRNASSA  
GRLQGLAGGAPGQKECRPFVYLP SGKMRPRSLEVTISTGEKAPANPEILLFLEEKTAANLDSATEPRAR  
PTPDGGASADLKEGPGNPEHSVTGRPPDTAASPRCHAQEGDPVDGTCVRDSCSFPEAVSGHPQASGSRSP  
GCPRCQDSHERKSPGSLSPQPLPQCKRHLKQVQLLFCEHDDEPICLICSLSQEHQGHVRPIEEVALEHK  
KKIQKQLEHLKLRKSGEEQSRSYGEEKAVSFLKQTEALKQVRQKLEQVYVYFLEQQEHFFVASLEDVGM  
VGQIRKAYDTRVSDIALLDALIGELEAKECQSEWELLQDIGDILHRAKTVPVPEKWTTPQEIQKQIQLL  
HQKSEFVEKSTKYFSETLRSEMEMFNVPELIGAQAHAVNVILDAETAYPNLIFSDDLKSVRLGNKWERLP  
DGPQRFDSCIIVLGSPSFLSGRRYWEVEVGDKTAWILGACKTSISRKGNMTLSPENGYWVIMMKENEYQ  
ASSVPPTRLLIKPEPKRVGIFVDYRVGSI SFYNVTARSHIYTFASCSFSGPLQPIFSPGTRDGGKNTAPL  
TICPVGGQGP

>Pyrin.cdna  
GGAAGCCAGACAGCTGGCTCGAGCCTCTCCTGCTCAGCACCATGGCTAAGACCCCTAGTGACCATCTGCT  
GTCCACCCCTGGAGGAGCTGGTGCCCTATGACTTCGAGAAGTTCAAGTTCAAGCTGCAGAACACCAGTGTG  
CAGAAGGAGCACTCCAGGATCCCCGGAGCCAGATCCAGAGAGCCAGGCCGGTGAAGATGGCCACTCTGC  
TGCTCACCTACTATGGGGAAGAGTACGCCGTGCAGCTCACCCTGCAGGTCCTGCGGGCCATCAACCAGCG  
CCTGCTGGCCGAGGAGCTCCACAGGGCAGCCATTTCAGGAATATTCCACACAAGAAAACGGCACAGATGAT  
TCCGAGCGTCCAGCTCCCTGGGGGAGAACAGCCAGGAGCCTGAAGACTCCAGACCACCCCGAGGGGA  
ACGAGGGGAACGGCCCTCGGCCGTACGGGGGCGGAGCTGCCAGCCTGCGGTGCAGCCAGCCCGAGGCCGG  
GAGGGGGCTGTGAGGAAGCCCTGAGCAAACGAGAGAGAAGGCCTCGGAGGGCTTGACGCGCAGGGC  
AAGCCTCGGACCCCGAGCCCGCCCTGCCGGGCGGAGAGAAGCCCGGCCCTGCAGGGCGCTAGAGGGGG  
GCCAGGCCGAGGTCCGGCTGCGCAGAAACGCCAGCTCCGCGGGGAGGCTGCAGGGGCTGGCGGGGGCGC  
CCCGGGCAGAAGGAGTGACGGCCCTTCGAAGTGTACCTGCCCTCGGGAAGATGCGACCTAGAAGCCTT  
GAGGTACCATTTCTACAGGGGAGAAGGCGCCCGCAATCCAGAAATTCTCCTGACTCTAGAGGAAAAGA  
CAGCTGCGAATCTGACTCGGCAACAGAACCCCGGGCAAGGCCACTCCGGATGGAGGGCATCTGCGGA  
CCTGAAGGAAGGCCCTGGAATCCAGAACATTCCGTACCGGAAGGCCACAGACCGGCTCGAGTCCC  
CGTGCCACGCCCAGGAAGGAGACCCAGTTGACGGTACCTGTGTGCGTGATTCTTGACGCTTCCCCGAGG  
CAGTTTCTGGGCACCCCGAGCCTCAGGCAGCCGCTACCTGGCTGCCCCCGGTGCCAGGACTCCCATGA  
AAGGAAGAGCCCGGAAGCCTAAGCCCCCAGCCCCCTGCCACAGTGTAAGCGCCACCTGAAGCAGGTCCAG  
CTGCTCTTCTGTGAGGATCAGGATGAGCCCATCTGCCTCATCTGCAGTCTGAGTCAGGAGCACCAGGCC  
ACCGGCTGCGCCCATTCAGGAGGTGCGCCTGGAACACAAGAAGAAATTCAGAAGCAGCTGGAGCATCT

## Forts. Fig. 1

GAAGAAGCTGAGAAAATCAGGGGAGGAGCAGCGATCCTATGGGGAGGAGAAGGCAGTGAGCTTTCTGAAA  
 CAAACTGAAGCGCTGAAGCAGCGGGTGAGAGGAGCTGGAGCAGGTGTACTACTTCTCTGGAACAGCAGG  
 AGCATTTCTTTGTGGCCTCACTGGAGGACGTGGGCCAGATGGTTGGGCAGATCAGGAAGGCATATGACAC  
 CCGCGTATCCCAGGACATCGCCCTGCTCGATGCGCTGATTGGGGAAGTGGAGGCCAAGGAGTGCCAGTCA  
 GAATGGGAACCTTCTGCAGGACATTGGAGACATCTTGACAGGGCTAAGACAGTGCTTCTCCCTGAAAAAGT  
 GGACCACTCCTCAAGAGATAAAACAAAAGATCCAACCTCTCCACCAGAAGTCAGAGTTTGTGGAGAAGAG  
 CACAAAGTACTTCTCAGAAACCCTGCGTTTCAGAAATGGAAATGTTCAATGTTCCAGAGCTGATTGGCGCT  
 CAGGCACATGCTGTTAATGTGATTCTGGATGCAGAAACCGCTTACCCCAACCTCATCTTCTCTGATGATC  
 TGAAGAGTGTTAGACTTGGAAACAAGTGGGAGAGGCTGCTGATGGCCCGCAAAGATTTGACAGCTGTAT  
 CATTGTTCTGGGCTCTCCGAGTTTCTCTCTGCGCGCGTTACTGGGAGGTGGAGTTGGAGACAAGACA  
 GCATGGATCCTGGGAGCCTGCAAGACATCCATAGCAGGAAAGGGAACATGACTCTGTCCGACAGAAATG  
 GCTACTGGGTGGTGATAATGATGAAGGAAAATGAGTACCAGGCGTCCAGCGTTCCCCGACCCGCTGCT  
 AATAAAGGAGCCTCCCAAGCGTGTGGGCATCTTCTGGACTACAGAGTTGGAAGCATCTCCTTTTACAAT  
 GTGACAGCCAGATCCACATCTATACATTGCGCCAGCTGCTCTTCTCTGGGCCCCCTTCAACCTATCTTCA  
 GCCCTGGGACAGTGATGGAGGGAAGAACACAGCTCCTCTGACTATCTGTCCAGTGGGTGGTCAGGGGCC  
 TGACTGAATGCCCAACACTGCATCTCTCTCTGCTTCTGGCCTTGTATCTTGCAATCAACTCAATAGT  
 CACGGAATGCCGACTAGGTGCTAGCTGCTATGGGAAATGCAAAAATAACAAAATAGTTACTGTGCCACG  
 GAGCCTTACCCGATTATAGCAGAGGTAAGTTAGGAACGAACATGTTAGTCAATCCGGGTGAAGACATGTAC  
 TGATGACACACCATGGATTTCAGAGGAGGAAGTACGGAGTCGTTGCATAATCCGCCCCCTGGTGGGTGGCA  
 CTCTCAGGTGCTCCTGAACAGAAGATTTGGCCCTCATTTTCCCTCAGAACCCACGGCAAGGATATATGT  
 CCCCTTGTCTCTCTGCTTCTGTCTTGAGGATATGGGAAGCCTAGAGAAACGCAAGCAGACTGGATTGGG  
 ATAGAAGTATTTGTGTACCTGGATTAATGAACATGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACCAAATCTTGC  
 TCTGTGGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCAGGTTCAAGC  
 GATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGCAGCTGGGATTACAGGTGCGTGCCACCACACCAGGCTGGTTTTCT  
 TGTATTTTTTAGTAGAGACGGGGGTTTACCATGTTAGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGA  
 TCCACCCGCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCACTGTGCCCGGCTATGATTCTT  
 TTTTTTTTTTTTTTTGAGACAAAGTTTTGCTCTTGTCAACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCAATCTTGG  
 CTCACCTGCAACCTCCGCTCCAGGTTCAAGAGATTCTCCTGCTCAGCCTCCGAGTAGCTGGGATTAC  
 AGGCGCCCGCCACCATGCCCCGCTAATTTTTTGCATTTTTTAGTAGACATGAGGTTTCATCATGTTGGCCA  
 GGCGGCTCTCAAACCTCCTGACCTCAGGTGATGCACCCACCTCAGCCTCCCAAAGTGCCAGGATTAAGGC  
 ATGAGCCACCATGCTGGCCATGATTCTTAAGAGAATTGACTGGGCCTCATGAATAAAAAAATTAGAAAA

.....

A.3

&gt;Pycard

MGRARDAILDALENLTAEELKKFKLLSVPLREGYGRI PRGALLSMDALDLTDKLVSFYLETYGAELTA  
 NVLRDMGLQEMAGQLQAATHQGSAAAPAGIQAPPQSAKPLHFIDQHRAALIRVNTNVEWLLDALYKGV  
 LTDEQYQAVRAEPTNPSKMRKLFSTPAWNWTCKOLLLQALRESQSYLVEDLERS

&gt;Pycard.cdna

GTCCAGGTTCCGCCCCGAGCCGACTTCCTCCTGGTCCGCGGCTGCAGCGGGTGAGCGGCGGCAGCGGC  
 CGGGGATCCTGGAGCCATGGGGCGCGCGCGACGCCATCCTGGATGCGCTGGAGAACCTGACCGCCGAG  
 GAGCTCAAGAAAGTTCAAGCTGAAGCTGCTGTCGGTGCCGCTGCGCGAGGGCTACGGGCGCATCCCGCGGG  
 GCGCGCTGCTGTCCATGGACGCTTGGACCTCACCAGCAAGCTGGTCAGCTTCTACCTGGAGACCTACGG  
 CGCGAGCTCACCCTAACGTGCTGCGCGACATGGGCCTGCAGGAGATGGCCGGGCAGCTGCAGGCGGCC  
 ACGCACCAGGGCTCTGGAGCCGCGCCAGCTGGGATCCAGGCCCCCTCCTCAGTCGGCAGCCAAGCCAGGCC  
 TGCATTTTATAGACCAGCACCGGGCTGCGCTTATCGCGAGGGTCAAAACGTTGAGTGGCTGCTGGATGC  
 TCTGTACGGGAAGGTCCTGACGGATGAGCAGTACCAGGCAGTGCGGGCCGAGCCCACCAACCAAGCAAG  
 ATGCGGAAGCTCTCAGTTTCAACACAGCCTGGAACCTGACCTGCAAGGACTTGCTCCTCAGGCCCTAA  
 GGGAGTCCCACTTACCTGGTGGAGGACCTGGAGCGGAGCTGAGGCTCCTCCGAGCAACACTCCGGTC  
 AGCCCCTGGAATCCCAACCAATCATCCTGAATCTGATCTTTTTATACACAATATACGAAAAGCCAGCTT  
 GAAAAA

.....

A.4

&gt;NALP1.hs

MAGGAWGRLACYLEFLKKEELKEFOLLANKAHSRSSSETPAQPEKTSMEVASYLVAQYGEQRAWDLA  
 LHTWEQMGLRSLCAQAQEGAGHSPSPFPSPSEPHLGSPTSQSTAVLMPWIHELPAAGCTQGSERRVLRQL

Forts. Fig. 1

PDTSGRRWREISASHLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTSTAVLGWSGSPQPSPSLAPREQEAPGTQWPLDE  
 TSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVGTPPPQAHSSLOPHHPWEPSPVRESLCSTWPKWKNEDFNQKFTQ  
 LLLLQRPHPRSQDPLVKRSWPDYVEENRGHLIEIRDLFGPGLDTQEPRIVILQGAAGIGKSTLARQVKEA  
 WGRGQLYGDRFQHVYFSCRELAQSKVVSALAEIGKDGATATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVWLQ  
 EPSSELCLHWSQPQPADALLGSLGKTLILPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSRKEYF  
 YRYFTDERQAIRAFRLVKSNKELWALCLVPWVSWLACTCLMQMKRKEKLTLTSKTTTTLCLHYLAQALQ  
 AQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKTLFSPDDLKRGHLDGAIISTFLKMGILQEHPIPLSYSFHLCFQEFF  
 AAMSYVLEDEKGRGKHSNCTIDLEKTL EAYGIHGLFGASTTRFLLGLLSDEGEREMENIFHCRLSQGRNL  
 MQWVPSLQLLLQPHSLESLSHCLYETRNKTLFTQVMAHFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLQLI  
 EGRQHRSTWSPSMVVLFRWVPVTDAYWQILFVSLKVTRNLKELDLGNSLSHSAVKSCLKTLRRPRCLLE  
 TLRLAGCGLTAEDCKDLAFGLRANQTLTDLDFSNVLM DAGAKHLQRLRQPSCKLQRLQLVSCGLSDC  
 CQDLASVLSASPSLKELDLQNNLDDVGVRLCEGLRHPACKLIRLGLDQTTLSDEMRQELRALEQEKPO  
 LLIFSRKPSVMTPIEGLDTGEMSNSTSSLRQRLGSERAASHVAQANLKLDDVSKIPIAIEIAEESPE  
 VVPVELLCVPSPASQGDHLTKPLGTDDDFWGP TGVPATEVVDKEKNLYRVHFPVAGSYRWPNTGLCFVVR  
 EAVTVEIEFCVWDQFLGEINPQHSWMVAGPLLDIKAEFGAVEAVHLPHFVALQGGHVDTSLSFQVAHFKEE  
 GMLEKPARVELHHIVLENPSFSPLGVLLKMIHNALRFIPVTSVLLYHRLHPEEVTFLHYLIPSDCSIR  
 KELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHLSGSGIRLQVKDKKDETLVWEALVKPGDLMPTTLIPACIAPVPSLD  
 APQLLHFVDQYREQLIARVTSVEVVLDKLHGQVLSQEQYERVLAENTRPSQMRKLFSLSQSWDRKCKDGL  
 YQALKETHPHLIMELWEKSGSKGLLPLSS

&gt;NALP1.cdna

TGGGAGCCAGCAGCCCGGGGCTCCACTCTGGGTTCTGAAAGCCCATCCCTGCTCTGCGGCTCCTCCCA  
 CCCCACCTCTTCTCAGCCTTGACGCTCAAGGGTTGATCTCAGGAGTCCAGGACCCAGGAGAGGGAAGAAT  
 CTGAGGAACACAGAACAAGATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCTGGCCTGTTACTTGGAGTTCCTGTAAG  
 AAGGAGGAGCTGAAGGAGTTCAGCTTCTGCTCGCAATAAAGCGCACTCCAGGAGCTCTTCGGGTGAGA  
 CACCCGCTCAGCCAGAGAACGAGTGGCATGGAGGTGGCCTCGTACCTGGTGGCTCAGTATGGGAGCA  
 GCGGGCCTGGGACCTAGCCCTCCATACCTGGGAGCAGATGGGGCTGAGGTCACTGTGCGGCCAAGCCAG  
 GAAGGGGCGAGGCCACTCTCCCTCATTCCTTACAGCCCAAGTGAACCCACCTGGGGTCTCCCAGCCAAC  
 CCACCTCCACCGCAGTGCTAATGCCCTGGATCCATGAATGCCGGCGGGGTGCACCCAGGGCTCAGAGAG  
 AAGGGTTTTGAGACAGCTGCCTGACACATCTGGACGCGCTGGAGAGAAATCTCTGCCCTCACACCTCTAC  
 CAAGCTCTTCCAAGCTCCCAAGCATGAGTCTCCAGCCAGGAGTCAACCAACGCCCCACATCCACAG  
 CAGTGCTGGGGAGCTGGGGATCCCCACCTCAGCCAGCCTAGCACCCAGAGAGCAGGAGGCTCCTGGGAC  
 CCAATGGCCTCTGGATGAAACGTCAGGAATTTACTACACAGAAATCAGAGAAAGAGAGAGAGAGAAATCA  
 GAGAAAGGCAGGCCCCCATGGGCAGCGGTGGTAGGAACGCCCCCAAGGCGCACAGCAGCCTACAGCCCC  
 ACCACCACCCATGGGAGCCTTCTGTGAGAGAGCCTCTGTTCACATGGCCCTGGAAAAATGAGGATTT  
 TAACCAAAAATTCACACAGCTGCTACTTCTACAAAGCCTCACCACAGAACGCAAGATCCCTGGTCAAG  
 AGAAGCTGGCCTGATTATGTGGAGGAGAATCGAGGACATTTAATTGAGATCAGAGACTTATTTGGCCAG  
 GCCTGGATACCCAGAACCTTCGCATAGTCATCTGACGGGGCTGCTGGAATTTGGGAAGTCAACACTGGC  
 CAGGCAGGTGAAGGAAGCCTGGGGGAGAGGCCAGCTGTATGGGGACCGCTTCCAGCATGTCTTCTACTTC  
 AGCTGCAGAGAGCTGGGCCAGTCCAAGGTGGTGAGTCTCGCTGAGCTCATCGGAAAAGATGGGACAGCCA  
 CTCGGCTCCCATTAGACAGATCCTGTCTAGGCCAGAGCGGCTGCTCTTCATCCTCGATGGGTAGATGA  
 GCCAGGATGGGTCTTGACAGGAGCCGAGTTCTGAGCTCTGTCTGCACTGGAGCCAGCCACAGCCGGCGGAT  
 GCACTGCTGGGCAGTTTCTGGGGAAAACTATACTTCCCGAGGCATCCTTTCTGATCACGGCTCGGACCA  
 CAGCTCTGCAGAACCTCATTCCTTCTTTGGAGCAGGCAGTTGGGTAGAGGTCTGGGGTTCTCTGAGTC  
 CAGCAGGAAGGAATATTTCTACAGATATTTACAGATGAAAGGCAAGCAATTAGAGCCTTTAGGTTGGTC  
 AAATCAAAACAAAGAGCTCTGGGCCCTGTGTCTGTGCCCCGGGTGTCTGGCTGGCCTGCACCTGGCCTGA  
 TGCAGCAGATGAAGCGGAAGGAAAACTCACACTGACTTCCAAGACCACCACAACCTCTGTCTACATTA  
 CCTTGCCCGAGGCTCTCCAAGCTCAGCCATTGGGACCCAGCTCAGAGACCTCTGCTCTCTGGCTGTGAG  
 GGCATCTGGCAAAAAAGACCCCTTTTCAGTCCAGATGACCTCAGGAAGCATGGGTAGATGGGGCCATCA  
 TCTCCACCTTCTTGAAGATGGGTATTCTTCAAGAGCACCCCATCCCTCTGAGCTACAGCTTCATTACCT  
 CTGTTTCCAGGAGTTCTTTGAGCAATGTCTATGTCTTGGAGGATGAGAAGGGGAGAGGTAACATTTCT  
 AATTGCATCATAGATTTGAAAAAGACGCTAGAAGCATATGGAATACATGGCCGTGTTTGGGGCATCAACCA  
 CACGTTTCTTATTGGGCCGTGTTAAGTGATGAGGGGAGAGAGAGATGGAGAACATCTTTCACCTGCCGGCT  
 GTCTCAGGGGAGGAACCTGATGCAGTGGGTCCCGTCCCTTCTCAGCTGCTGCTGCAGCCACACTCTCTGGAG  
 TCCCTCCACTGCTTGTATGAGACTCGGAACAAACGTTCTCTGACACAAGTGATGGCCCATTTTCAAGAAA  
 TGGGCATGTGTGTAGAAACAGACATGGAGCTCTTAGTGTGCACTTTCTGCATTAAATTCAGCCGCCACCT  
 GAAGAAGCTTCAGCTGATTGAGGGCAGGCAGCACAGATCAACATGGAGCCCCAGCATGGTAGTCTGTTC  
 AGGTGGGTCCAGTCCAGATGCCTATTGGCAGATTCTCTTCTCCGTCCTCAAGGTCAACAGAAACCTGA



Forts. Fig. 1

AGGAGCTGGACCTAAGTGGAAACTCGCTGAGCCACTCTGCAGTGAAGAGTCTTTGTAAAGACCTTGAGACG  
 CCTTCGCTGCCTCCTGGAGACCTTGCAGGTTGGCTGGCTGTGGCCTCACAGCTGAGGACTGTAAGGACCTT  
 GCCTTTGGGCTGAGAGCCAACCCAGACCTTGACCGAGCTGGACCTGAGCTTCAATGTGCTCATGGATGCTG  
 GAGCCAAAACACCTTTGCCAGAGACTGAGACAGCCGAGCTGCAAGCTACAGCGACTGCAGCTGGTCAGCTG  
 TGGCCTCACGCTGTGACTGCTGCCAGGACCTGGCCTCTGTGCTTAGTGCCAGCCCAGCCTGAAGGAGCTA  
 GACCTGCAGCAGAAACAACTTGGATGACGTTGGCGTGCAGTGTCTGTGAGGGGGCTCAGGCATCTTCGCT  
 GCAAACCTCATACGCCTGGGGCTGGACCAGACGACTCTGAGTGATGAGATGAGGCAGGAGCTGAGGGCCCT  
 GGAGCAGGAGAAGCCTCAGCTGCTCATCTTCAGCAGACGGAAACCAAGTGTGATGACCCCTATTGAGGGC  
 CTGATACGGGAGAGATGAGTAATAGCACTCCTCACTCAGCGCGAGAGACTCCGATCAGAGAGGGCGG  
 CTTCCTCATGTTGCTCAGGCTAATCTCAAACCTCTGGACGCTGAGCAAGATCTTCCAAATTGCTGAGATTGC  
 AGAGAAAGCTCCCCAGAGGTAGTACCGTGGAAACTCTTGTGCTGCTTCTCTGCTCTCAAGGGGAC  
 CTGCATACGAAGCCTTTGGGGACTGACGATGACTTCTGGGGCCCCACGGGGCCTGTGGCTACTGAGGTAG  
 TTGACAAAAGAAAAGAACTTGTACCGAGTTCACCTTCCCTGTAGCTGGCTCCTACCGCTGGCCCCAACACGGG  
 TCTCTGCTTTGTGGTGAGAGAAGCGGTGACCGTTGAGATTGAATCTGTGTGTGGGACCACTTCTCTGGGT  
 GAGATCAACCCACAGCAGCTGGATGGTGGCAGGGCCTCTGCTGGACATCAAGGCTGAGCTGGAGCCG  
 TGGAAAGCTGTGCACTCCCTCACTTTGTGGTCTCTCAAGGGGCCACTGTGGACACATCCCTGTTTCCAAGT  
 GGCCCACTTTAAAGAGGAGGGGATGCTCTCTGGAGAAGCCAGCCAGGGTGGAGCTGCATCACATAGTTCTG  
 GAAAACCCAGCTTTTCCCCCTTGGGAGTCTCTCTGAAAATGATCCATAATGCCCTGCGCTTCATTCCCG  
 TCACCTCTGTGGTGTTGCTTTACCACCGCCTCCATCCTGAGGAAGTCACTTCCACCTCTACCTGATCCC  
 AAGTGA CTGCTCCATTCCGAAGGAACCTGGAGCTCTGCTATCGAAGCCCTGGAGAAGACAGCTGTTCTCG  
 GAGTTCTACGTTGGCACTTGGGATCAGGGATCAGGCTGCAAGTGAAGACAAGAAGATGAGACTCTGG  
 TGTGGGAGCCCTTGGTGAAACCAGGAGATCTCATGCTCTGCAACTACTCTGATCCCTCCAGCCTGCATAGC  
 CGTACCTTCACCTCTGGATGCCCCGCACTTGTCTGCACTTTGTGGACCAGTATCGAGAGCAGCTGATAGCC  
 CGAGTGACATCGGTGGAGGTTGTCTTGGACAACTGCATGGACAGGTGCTGAGCCAGGAGCAGTACGAGA  
 GGGTGCTGGCTGAGAAACACGAGGCCCGAGCAGTGGGAAGCTGTTCAGCTTGAGCCAGTCTGGGACCG  
 GAAGTGCAAGAGATGGACTCTACAAGCCCTGAAGGAGCCCATCTCACTCATTATGGAACCTCTGGGAG  
 AAGGGCAGCAAAAAGGGA CTCTGCCACTCAGCAGCTGAAGTATGAAACACCAGCCCTTGACCTTGAGTC  
 CTGGCTTTTGGCTGACCCCTTCTTGGGTCTCAGTTTCTTTCTCTGCAACAAGTTGCCATCTGGTTTGCCT  
 TCCAGCAGCTAAAGATTAATGGAACCTTTGATGATGCTCTTGGTGGGCATTTATGTGCTCATGCCAGGGATGCCA  
 CAGGGGCGCCCACTCAGTCCAGTTGGCCTTAACAGCATCTCAGGGAAGTTCATCTGAGAGCTGGCAAGACCTTG  
 CAGACCTCTAGAGCCTCATCTGGTGGCCACAGCAGCCAAAGCTAGAGCCCTCCGATCCCATCCAGGCG  
 CAAAGAGGAATAGGAGGGACATGGAACCATTTGCCCTCTGGCTGTGTCAAGGGTGAGCCCCAAAATTGGG  
 GTTCAGCGTGGGAGGCCACGTGGATTCTTGGCTTTGTACAGGAAGATCTACAAGAGCAAGCCAAACAGAGT  
 AAAGTGAAGGAAGTTTATTTCAGAAAATAAAGGAGTATCACTGCTCTTTAGAAATTTGTCTAGCAGACTT  
 TCCAGTTTTTACCAGAAAACCCCTATAAATTAATAATTTTACTTTAAATTTAAGAAATTAATAAATAACA  
 AAAAAAGAAAAAATGAAAAATAAAGGAATAAGAAGTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**>NALP2/Py7.hs**

MVSSAQMGNFLQALLEQLSQDELSKFYKYLITTFSLAHELQKIPHKEVDKADGKQLVEILTTHCDSYWVEMA  
 SLQVFEKMHMRMDLSERAKDEVREAALKSFNKRKPLSLGITRKRPPLDVDEMLERFKTEAQFTETKGNVI  
 CLGKEVFKGKKPKDKNRCRYILKTKFREMWWKSWPGDSKEVQVMAERYKMLIPFSNPRVLPGPFSYTVLVY  
 PAGLKFTTLAQKMLDWAEDNIHKFKYAFYLSCRELSRVLGPCSFAELVFRDWPPELQDDIPHILAQARKII  
 FVIDGFDLGAAPGALIEDICGDWEKKKVPVVLGSLNLRVMPKAAALVTRTPRALRDLRILAEPTIYIR  
 VEGFLEEDRRAYFLRHFGDEQDQAMRAFELMRSNAALFQLGSAPAVCWI VCTTTLKLQMEKGEDPVPTCLTRT  
 GLFLRFLCSRFPQGAQLRGALRTL SLLAAQGLWAQTSVLHREDLERLGVQESDLRLFLDGDILRQDRVSKG  
 CYSFIHLSFQOFLTALFYTLKEEEEEEDRGHTWDIGDQVKLLSGVERL RNPDLIQAGYYSFGLANEKRAKE  
 LEATFVGRMSPDIKQELLRCDISCKGGHSTVTDQELLGCLYESQEEELVKEVMAQFKEISHLNNAVDVVP  
 SSFVCKHCRNLQKMSLQVIKENLPENVTASEDAEVSQDDQHMLPFWTDLCSIFGSNKDLMGLAINDSF  
 LSASLVRI LCEQIASDTHLQRVVFKNISPADAHRNLCALRGHKTVTYTLTQGNQDDMFALCEVLRHP  
 ECNLRYLGLVSCSATTQOWADLSALEVNQSLTCVNLSDNELLDEGAKLYTLTRHPKCFQLRSLLENCH  
 TEANCKDLAAVLVVSRELTHLCLAKNP IGNTGVKFLCEGLRYPECKLQTLVLWNCDITSDBGCDLTKLLQE  
 KSSLLCLDLFGLNIIGVKGMKFLCEALRKPLCNLRCLWLWGCSEIPPFSCEDLCSALSCNQSLVTLDLGQNPL  
 GSSGVKMLPETHLTSSGGTLTRLRLKIDDFNDELNKLBBEIEEKNPOLI IDETEKHPWAERPSSHDFMI

**>NALP2Py7.dna**

Forts. Fig. 1

AAAAACTTATTAGAGCTTTCTCAACCTGCAGCCCTCATCTCCGCCGGCGAGTAGGGCCAGGTGTTGGGAGC  
 TCCCACGTGGGACAAGATGGTGTCTTCGGCGCAGATGGGCTTCAACCTGCAGGCTCTCCTGGAGCAGCTCA  
 GCCAGGATGAGTTGAGCAAGTTCAAGTATCTGATCACGACCTTCTCCTGGCACACGAGCTCCAGAAGATC  
 CCCCACAAGGAGGTAGACAAGGCTGATGGGAAGCAACTGGTAGAAATCCTCACCACCCATTGTGACAGCTA  
 CTGGGTGGAGATGGCGAGCCTCCAGGTCTTTGAAAAGATGCACCGAATGGATCTGTCTGAGAGAGCAAAGG  
 ATGAAGTCAGAGAAGCAGCTTTGAAATCCTTTAATAAAAGGAAACCTCTATCATTAGGGATAACACGGAAA  
 GAACGACCACCTCTAGACGTGGACGAAATGCTGGAGCGCTTCAAAACAGAAGCACAAGCGTTTACAGAAAC  
 GAAAGGAAATGTCTGCTGGGTAAAGAAGTCTTTAAAGGAAAAAGCCAGACAAAGACAATAGGTGCA  
 GGTATATATTGAAGACGAAGTTCCGGGAGATGTGGAAGAGCTGGCCTGGAGATAGCAAAGAGGTCCAGGTT  
 ATGGCTGAGAGATACAAGATGCTGATCCCATTCAGCAACCCAGGGTGCTTCCCGGGCCCTTCTCATACAC  
 GGTGGTGTCTGATGGTCTGCAGGCCTTGGGAAACCACGCTGGGCCAGAACTAATGCTAGACTGGGCAG  
 AGGACAACCTCATCCACAAATTCAAATATGCGTTCTACCTCAGCTGCAGGGAGCTCAGCCGCTTGGGCCCG  
 TGCAGTTTTCAGAGCTGGTCTTCAGGGACTGGCCTGAATTGCAGGATGACATTCACACATCCTAGCCCCA  
 AGCACGGAAATCTTGTTCGTGATTGACGGCTTTGATGAGCTGGGAGCCGACCTGGGGCGCTGATCGAGG  
 ACATCTGCGGGGACTGGGAGAAGAAGAAGCCGGTGCCGTCCTCTGGGGAGTTTGTGAACAGGGTGATG  
 TTACCCAAAGGCCGCCCTGCTGGTCACACGCGGCCAGGGCCCTGAGGGACCTCCGGATCCTGGCGGAGGA  
 GCCGATCTACATAAGGGTGGAGGGCTTCTGGAGGAGGACAGGAGGGCTATTTCCTGAGACACTTTGGAG  
 ACGAGGACCAAGCCATGCGTGCTTTGAGCTAATGAGGAGCAACGCGGCCCTGTTCCAGCTGGGCTCGGCC  
 CCGCGGTGTGCTGGATCGTGTGCACGACTCTGAAGCTGCAGATGGAGAAGGGGGAGGACCCGGTCCCCAC  
 CTGCCCTCACCCGACCGGGCTGTTCTGCGTTTCTCTGCAGCCGGTTCCCGCAGGGCGCACAGCTGCGGG  
 GCGCGCTGCGGACGCTGAGCCTCCTGGCCGCGCAGGGCCTGTGGGCGCAGACGTCCTGCTTACCCGAGAG  
 GATCTGGAAGGCTCGGGGTGCAGGAGTCCGACCTCCGTCTGTTCTGGACGGAGACATCCTCCGCCAGGA  
 CAGAGTCTCCAAAGGCTGCTACTCCTTCATCCACCTCAGCTTCAGCAGTTTCTCACTGCCCTGTTCTACA  
 CCCTGGAGAAGGAGGAGGAAGAGGATAGGGACGCCACACCTGGGACATTGGGGACGTACAGAAGCTGCTT  
 TCCGGAGTAGAAAGACTCAGGAACCCCGACCTGATCCAAGCAGGCTACTACTCCTTTGGCCTCGCTAACGA  
 GAAGAGAGCCAAAGGAGTTGGAGGCCACTTTTGGCTGCCGGATGTCAACCGACATCAAACAGGAATTGCTGC  
 GATGCGACATAAGTTGTAAGGGTGGACATTCAACGGTGAAGACCTGCAGGAGCTCCTCGGCTGTCTGTAC  
 GAGTCTCAGGAGGAGGAGCTGGTGAAGGAGGTGATGGCTCAGTTCAAAGAAATATCCCTGCACCTTAAATGC  
 AGTAGAGCTTGTGCGCATCTTCATTCTGCGTCAAGCACTGTGCAAAACCTGCAGAAATGTCACTGCAGGTAA  
 TAAAGGAGAATCTCCCGGAGAATGTCACTGCGTCTGAATCAGACGCCGAGGTTGAGAGATCCCAGGATGAT  
 CAGCACATGCTTCTTCTGACCGACCTTGTTCATATTTGGATCAAATAAGGATCTGATGGGTCTAGC  
 AATCAATGATAGCTTTCTCAGTGCCTCCCTAGTAGGATCCTGTGTGAACAAATAGCCTCTGACACCTGTC  
 ATCTCCAGAGAGTGGTGTTCAAAAACATTTCCCGAGCTGATGCTCATCGGAACCTCTGCCTAGCTCTCGA  
 GGTCAAGACTGTAACGTATCTGACCCTTCAAGGCAATGACCAGGATGATATGTTTTCCCGATTGTGTGA  
 GGTCTTGAGACATCCAGAATGTAACCTGCGATATCTCGGTTGGTGTCTTGTTCGGCTACCACTCAGCAGT  
 GGGCTGATCTCTCCTTGGCCCTTGAAGTCAACCACTCCCTGACGTGCGTAAACCTCTCCGACAATGAGCTT  
 CTGGATGAGGGTGCTAAGTTGCTGTACACAACCTTTGAGACACCCCAAGTGCTTTCTGCAGAGGTTGTGCTT  
 GGAAAACCTGTCACTTACAGAAGCCAATTGCAAGGACCTTGTGCTGTGTGTTGGTTGAGCCGGGAGCTGA  
 CACACCTGTGCTTGGCCAAGAACCCCATTTGGGAATACAGGGGTGAAGTTTCTGTGTGAGGGCTTGAGGTAC  
 CCCGAGTGTAACCTGCAGACCTTGGTGTCTTGGAACTGCGACATAACTAGCGATGGCTGCTGCGATCTCAC  
 AAAGCTTCTCCAAGAAAAATCAAGCCTGTTGTGTTGGATCTGGGGCTGAATCACATAGGAGTTAAGGGAA  
 TGAAGTTCTGTGTGAGGCTTTGAGGAAACCACTGTGCAACTTGAGATGTCTGTGGTTGTGGGGATGTTCC  
 ATCCCTCCGTTTCAGTTGTGAAGACCTCTGCTCTGCCCTCAGCTGCAACCAGAGCCTCGTCACTCTGGACCT  
 GGGTCAGAATCCCTTGGGGTCTAGTGGAGTGAAGATGCTGTTTGAACCTTGACATGTTCCAGTGGCACCC  
 TCCGGACACTCAGGTTGAAAAATAGATGACTTTAATGATGAACTCAATAAGCTGCTGGAAGAAATAGAAGAA  
 AAAAACCACAACGTATTATTGATACTGAGAAACATCATCCCTGGGCAGAAAGGCCTTCTTCTCATGACTT  
 CATGATCTGAATCCCCCGAGTCATTCTCATGAAAGTCATCGATTTTCCAGGTGTTGGTGAAGTGGC  
 TGTGACTCTCTCCTCCCGGCCCTACCCCTCAGGATAATGAGTTTATTGCTGGCTAGATGTTTATGAGC  
 CATGATCTGCTCTGTTTATACCTGCACACATCTTATCTTTGTTACATATGAAATATCTGTATCACGG  
 GTATATTGAGAGAAATAAAGGTGAGAGCATTACAAAAA

.....

1.6

>NALP3/PY5.hs

MLRTAGRDGL CRLSTYLEEL EAVELKKFKL YLGTATELGE GKIPWGSMEK AGPLEMAQLL  
 ITHFGPEEAW RLALSTFERI NRKDLWERGQ REDLVRDPQE TYRDYVRRKF RLMEARNRL  
 GECVNLSHRY TRLLLVKEHS NPMQVQQQLL DTGRGHARTV GHQASPIKIE TLFEPDEERP

Forts. Fig. 1

EPPRTVVMQG AAGIGKSMIA HKVMLDWADG KLFQGRFDYL FYINCREMNO SATECSMQLD  
 IFSCWPEPSA PLQELIRVPE RLLFIIDGFD ELKPSFHDPO GPWCLCWECK RPTELLINSL  
 IRKKLLPELS LLITTRPTAL EKLHRLLEHP RHVEILGFSE AERKEYFYKY FHNAEQAGQV  
 FNYVRDNEPL FTMCFVPLVC WVVCTCLQQQ LEGGGLLRQT SRTTTAVYML YLLSLMQPKP  
 GAPRLQPPPN QRGCLSLAAD GLWNQKILFE EQDLRKHGLD GEDVSAFLNM NIFQKDINCE  
 RYYSFIHLSF QEFFAAMYI LDEGEGGAGP DQDVTRLLTE YAFSERSFLA LTRFLFGLL  
 NEETRSHLEK SLCWKVSPHI KMDLLQWIQS KAQSDGSTLQ QGSLEFFSCL YEIQEEEFIQ  
 QALSHFQVIV VSNIAKMEH MVSSFCLKRC RSAQVLHLYG ATYSADGEDR ARCSAGAHTL  
 LVQLRPRTV LLDAYSEHLA AALCTNPNI ELSLYRNALG SRGVKLLCQG LRHPNCKLON  
 LRLKRCRISS SACEDLSAAL IANKNLTRMD LSGNGVGFPF MMLLCEGLRH PQCRLOMIQL  
 RKCQLESAC QEMASVLGTN PHLVELDLTG NALEDLGLRL LCQGLRHPVC RLRTLWLKIC  
 RLTAACDEL ASTLSVNQSL REIDLISNEL GDLGVLLCE GLRHPTCKLQ TLRGLICRLG  
 SAACEGLSV LQANHNLREL DLSFNDLGDW GLWLLAELQ HPACRLQKLW LDSCGLTAKA  
 CENLYFTLGI NQTLTDLYLT NNALGDTGVR LLCKRLSHPG CKLRVLWLFG MDLNMKTHSF  
 PEPLQPDVAVR DLYPRQFPAG NRNHRLFSSC RRPSSSTASVD MGVGTGDAQMS QHFPLGHQNS  
 APHLRPTGQL REYVLNLISG

&gt;NALP3/PY5.dna

atgctacgaaccgacggcagggacggcctctgtgcgctgtccacactacttggagaactc  
 gaggtgtggaactgaagaagtcaagttatacctggggaccgacagagctgggagaa  
 ggcaagatccccctggggaagcatggagaagggcgggtccccctggaaatggcccagctgtctc  
 atcaccacacttcggggccagaggagggcctggaggttggtctcagcacctttagcgggata  
 aacaggaaggacctgtgggagagaggacagagagaggacctggtgagggatccccaggaa  
 acctacagggaactatgtccgcaggaattccggctcatggaagaccgcaatgcgcgccta  
 ggggaatgtgtcaacctcagccaccgggtacaccgggtcctgtggtgaaggagcactca  
 aaccccatgcagggtccagcagcagcttctggacacaggccggggacacgcgaggaccgtg  
 ggacaccaggctagccccatcaagatagagacctctttagccagacgaggagcgcccc  
 gagccaccgcgaccgtggtcatgcaaggcgcgccagggataggcaagtcctgctggca  
 cacaaggtgatgctggactggcgacgggaagctcttccaaggcagatttgattatctc  
 ttctacatcaactgcagggagatgaaccagagtgccacggaatgcagcatgcaagacctc  
 atcttcagctgctggcctgagcccgcgccctctccaggagctcatccgagttcccgag  
 cgctctctttcatcatcgacggcttcgatgagctcaagcctctcttccacgatccctcag  
 ggaccttggtgctctgtctggaggagaaacggccacggagctgcttcttaacagctta  
 attcggagaagcgtgctccctgagctatcttctcatcaccacacggccacggcttg  
 gagaagctccaccgtctgctggagcaccacaggcatgtggagatcctgggcttctctgag  
 gcagaaaggaaggaatacttctacaagtatctccacaatgcagagcagggcgggccaagtc  
 ttcaattacgtgagggacaacgagcctctcttccacatgtgcttctgctccccctggtgtgc  
 tgggtggtgtgacctgctccacgacgagctggagggtgggggctgttgagacagacg  
 tccaggaccacactgcagtgatgctctacgtgctgagctgagtgatgcaaccaagccg  
 ggggccccgcgctccagccccacccaaccagagagggttgtgctccttggcggcagat  
 gggctctggaatcagaaaatcctatttgaggagcaggacctccggaagcacggcctagac  
 ggggaagacgtctctgcttctcctcaacatgaacatcttccagaaggacatcaactgtgag  
 aggtactacagcttcatccacttgagtttccaggaattcttgcagctatgtactatatac  
 ctggacgagggggaggcggggcccagaccaggacgtgaccaggctgttgaccgag  
 tacgcgttttctgaaaggagcttctggcactcaccagccgttctgtttggactcctg  
 aacgaggagaccaggagccacctggagaagagtctctgctggaaggtctcgccgcacatc  
 aagatggacctgtgacgtggatccaaagcaagctcagagcgacggctccaccctgcag  
 cagggtccttggaagttcttcagctgcttgtagagatccaggaggaggagtttatccag  
 caggcctgagccacttccaggtgatcggtgagcaacattgcctccaagatggagcac  
 atggtctcctcgttctgtctgaagcgctgcaggagcgccagggtgctgcacttgatggc  
 gccacctacagcgcgacggggaagaccgcgcgaggtgctccgcaggagcgcacacgctg  
 ttggtgcagctcagaccagagaggaccttctgctggacgcctacagtgaacatctggca  
 gcggcctgtgtcacaatccaaacctgatatagagctgtctgtaccgaaatgcccctgggc  
 agccgggggtgcaagctgctctgtcaaggactcagacaccccaactgcaaaactcagaac  
 ctgagggtgaagaggtgcgcacatctccagctcagcctgcgaggacctctctgcagctctc  
 atagccaataagaatttgacaaggatggatctcagtggaacggcggttggtatcccgagc  
 atgatgctgcttgcgagggcctgcggcatccccagtgaggtgcagatgattcagttg  
 aggaagtgtcagctggagtcggggcttgtcaggagatggcttctgtgctcggcaccaac

Forts. Fig. 1

ccacatctggttgagttggacctgacaggaaatgcactggaggatttgggcctgaggtta  
 ctatgccagggactgagggcaccagctctgcagactacggactttgtggctgaagatctgc  
 cgcctcactgctgctgctgctgagcagctggcctcaactctcagtggaaccagagcctg  
 agagagctggacctgagcctgaatgagctgggggacctcggggtgctgctgctgctgag  
 ggctcaggcatcccacgtgcaagctccagacctcgcggtgggcatctgccggctgggc  
 tctgccgctgtgaggggtcttctgtggtgctccaggccaaccacaacctccgggagctg  
 gacttgagtttcaacgacctgggagactggggcctgtggttgctggctgaggggctgcaa  
 catcccgcctgcagactccagaaactgtggctggatagctgtggcctcacagccaaggct  
 tgtgagaatctttacttcacctggggatcaaccagaccttgaccgacctttacctgacc  
 aacaacgccctaggggacacaggtgtccgactgctttgcaagcggtgagccatcctggc  
 tgcaaaactccgagtcctctggttatttgggatggacctgaataaaatgacccacagtttt  
 ccggagccattacagccagacgctgtaagggacctgtaccaagacagtttccggctggg  
 aatcgaaaccacaggtctcttagttcctgcagaagaccgagctccacggcatccgttgat  
 atgggctgacccggtgacgctcaaagtgcgagcactttccacttgacatcagaatagt  
 gctccacatttgaggcccacaggccagctgcgggagtacgtgctcaacctttctggttaa

.....  
 >NALP4/PY6.hs

1.7

MADSSSSSFFPFDGLLLYLEELNKEELNTFKLFLKETMEPEHGLTPWNEVKKARREDLANLMKKYYPGEKA  
 WSVSLKIFGKMNLDKLCERAKEEINWSAQTIGPDDAKAGETQEDQEAFLVIVNTGVPNSWATDPYWSAAPR  
 ESGRIAGGDGTEYRNRIKEKFCITWDKKS LAGKPEDFHHGIAEKDRKLLLEHLFDVDVKTGAQPQIVVLOGA  
 AGVGKTTLVKAMLDWAEGSLYQQRFKYV FYLNGREINQLKERSFAQLISKDWPSTEGPIEEIMYQPSLL  
 FIIDSFDELNF AFEEPEFALCEDWTQEHFVSFLMSLLRKVMLPEASLLVTTTLTTSKRLKQLLKNHYVE  
 LLGMSDAREEYIYQFFEDKRWAMKVFSSLSKSNEMLFMSMCQVPLVCWAACCTCLKQQMEKGGDVTLTCQTTT  
 ALFTCYISSLFTFVDGGSPSLPNQAQLRRLCQVAAKGIWMTYV FYRENLRRLGLTQSDVSSFMDSNIIQK  
 DAIEYENCYVFTLHVQEFFAAMFYMLKGSWEAGNPSCQPFEDLSLLQSTS YKDPHLLTQMKCFLLGLLNED  
 RVKQLERTFNCMSLKI KSKLLQCMFVLGNDSYPSQLGFLELFHCLYETQDKAFISQAMRCFPKVAINIC  
 EKIHLLVSSFLKHCRCRLRTIRLSVTVVFEKKILKTSLPNTTWEWMGNGRAIGQIRPLECPPEEDFLVDCAH  
 GGAALDALAFPKYTYFYSNTIL

>NALP4/Py6.dna

ATGGCAGATTTCATCATCATCTTCTTTCTTTCTGATTTTGGGCTGCTATTGTATTTTGGAGGAGCTAAACAA  
 AGAGGAATTAAATACATTCAAGTTATTCTTAAGGAGACCATGGAACCTGAGCATGGCCTGACACCCCTGGA  
 ATGAAGTGAAGAAGGCCAGGCGGGAGGACCTGGCCAATTTGATGAAGAAATATATCCAGGAGAGAAAGCC  
 TGGAGTGTGCTCTCAAAATCTTTGGCAAGATGAACCTGAAGGATCTGTGTGAGAGAGCGAAAGAAGAGAT  
 CAACTGGTTCGGCCAGACTATAGGACAGATGATGCCAAGGCTGGAGAGACACAAGAAGATCAGGAGGCAG  
 TGCTGGTCATAGTTAACACAGGGGTCCCCAATCTCTGGGCCACAGACCCCTACTGGTTCGGCGGCCCCCTCGG  
 GAATCAGGTTCGATAGCAGGAGGTGATGGAACAGAATACAGAAATAGATAAAGGAAAAATTTTGCATCAC  
 TTGGGACAAGAAGTCTTTGGCTGGAAAGCCTGAAGATTTCCATCATGGAATTGCAGAGAAAGATAGAAAAAC  
 TGTGGAAACACTTGTTCGATGTGGATGTCAAACCGGTGCACAGCCACAGATCGTGGTGTCTTCAGGGAGCT  
 GCTGGAGTTGGGAAAAACAACCTTGGTGAGAAAGGCAATGTTAGATTGGGCAGAGGGCAGTCTCTACAGCA  
 GAGGTTTAAGTATGTTTTTTATCTCAATGGGAGAGAAATTAACCAGCTGAAAGAGAGAAGCTTTGCTCAAT  
 TGATATCAAAGGACTGGCCAGCACAGAAGGCCCATTTGAAGAAATCATGTACCAGCCAAGTAGCCTCTTG  
 TTTATTATTGACAGTTTCGATGAACCTGAACCTTTGCTTTGAAGAACCTGAGTTTGCACTGTGCGAAGACTG  
 GACCCAAGAACACCCAGTGTCTTCTCATGAGTAGTTTGTGCTGAGGAAAGTGATGCTCCCTGAGGCATCCT  
 TATTGGTGACAAAGACTCACAACTTCTAAGAGACTAAAGCAGTTGTTGAAGAATCACCATTATGTAGAG  
 CTACTAGGAATGTCTGAGGATGCAAGAGAGGAGTATATTTACCAGTTTTTGAAGATAAGAGGTGGGCCAT  
 GAAAGTATTGAGTTCACTAAAAAGCAATGAGATGCTGTTTAGCATGTGCCAAGTCCCCCTAGTGTGCTGGG  
 CCGCTTGTACTTGTCTGAAGCAGCAAATGGAGAAGGGTGGTGATGTACATTTGACCTGCCAAACAACCA  
 GCTCTGTTTACCTGCTATATTTCTAGCTTGTTCACACCAGTAGATGGAGGCTCTCCTAGTCTACCCAACCA  
 AGCCCAGCTGAGAAGACTGTGCCAAGTCTGCTGCCAAGGAATATGGACTATGACTTACGTGTTTTACAGAG  
 AAAATCTCAGAAGGCTTGGGTAACTCAATCTGATGTCTCTAGTTTTATGGACAGCAATATTATTACAGAG  
 GACGCAGAGTATGAAAACCTGCTATGTGTTACCCACCTTCATGTTACAGAGTTTTTTGCAGCTATGTTCTA  
 TATGTTGAAAGGAGTTGGGAAGCTGGGAACCTTCTGCGCAGCCTTTTGAAGATTTGAAGTCATTACTTC  
 AAAGCACAAAGTTATAAAGACCCCCATTTGACACAGATGAAGTGCTTTTTGTTTTGGCCTTTTGAATGAAGAT  
 CGAGTAAACAACCTGGAGAGGACTTTTAACTGTAAATGTCACTGAAGATAAAATCAAAGTTACTTCAGTG

Forts. Fig. 1

TATGGAAGTATTAGGAAACAGTGACTATTCTCCATCACAGCTGGGATTTCTGGAGTTGTTTCACTGTCTGT  
 ATGAGACTCAAGATAAAGCGTTTATAAGCCAGGCAATGAGATGTTTCCCAAAGGTTGCCATTAATATTTGT  
 GAGAAAATACATTGCTTGTATCTTCTTTCTGCCTTAAGCACTGCCGGTGTGCGGACCATCAGGCTGTC  
 TGTAACGTGGTATTTGAGAAGAAGATATTAAAAACAAGCCTCCCAACTAACACTTGGGAGTGGATGGGAA  
 ACGGGAGAGCTATTGGACAAATAAGACCTCTGGAGTGCCAGAGGAAGACTTCTGGTGGACTGTGCCAC  
 GGTGGAGCTGCACGTGGATGCTCTTGCTTTCCAAAGTACACTTACTTTTACTCCAATACTATCCTCTGA

1.8

#####  
 >NALP5/Py8.hs (contiens py12)  
 MSDVNPPSDT PIPFSSSSSTH SSHIPPWTFS CYPGSPCENG VMLYMRNVSH EELQRFKQLL  
 LTELSTGTMP ITWDQVETAS WAEVVHLLIE RFPGRRAWDV TSNIFAIMNC DKMCVVVRRE  
 INAILPTLEP EDLNVGETQV NLEEGESGKI RRYKSNVMEK FFPIWDITTW PGNQRDFFYQ  
 GVMRHEEYLP CLLLPKRPQG RQPKTVAIQG APGIGKTLA KKMVFEWARN KFYAHKRWCA  
 FYFHCQEVNQ TTDQSFSLEI EQKWPGSQDL VSKIMSKPDQ LLLLLLDGFEE LTSTLIDRLE  
 DLSWDWRQKL PGSVLLSSIL SKTMLPEATL LIMIRFTSWQ TCKPLKCPKPS LVTLPGFNTM  
 EKIKYFQMYF GHTEEGDQVL SFAMENTILF SMCVRPVVW MVCSGLKQOM ERGNLTQSC  
 PNATSVFVRY ISSLFPTRAE NPSRKIHQAQ LEGLCHLAAD SMWHRKWVLG KEDLEEAKLD  
 QTGVTAFLGM SILRRIAGEB DHYVFTLVTF QEFFAALFV LCFPQRLKNF HVLSHVNIQR  
 LIASPRGSKS YLSHMGFLFLF GFLNEACASA VEQSFQCKVS FGNKRKLLKV IPLLHKCDPP  
 SPGSGVPQLF YCLHEIREEA FVSQALNDYH KVVLRIGNNK EVQVSAPCLK RCQYLHEVEL  
 TVTLNFMNVW KLSSSSHPGS DLRRVNSTML NQDLIGVLTG NQHLRYLEIQ HVEVESKAVK  
 LLCRVLRSPR CRLQCLRLD CLATPRIWTD LGNNLQNGH LKTLILRKNS LENCQAYYLS  
 VAQLERLSQS KMLTHLSLAE NALKDEGAKH IWNALPHLC PLQRLVLRKC DLTFNCCQDM  
 ISALCKNKTL KSLDLSFNSL KDDGVILLCE ALKNPDCTLQ ILELENCLFT SICQAMASM  
 LRKNQHLRHL DLSKNAIGVY GILTLCFAFS SQKKREEVIF TIHNSQDLEA PKCPSTDEWI  
 KKMWYLRTME YYSAMKKKLLK CRNNGIITA HWCSGPTCSI LPKNPLFPQN LSSQPCIKME  
 GDKSLTFSSY GLQWCLYELD KEFQTFKEL LKKKSSEST CSIPQFEIEN ANVECLALLL  
 HEYVGASLAW ATSIISIFENM NLRTLSEKAR DDMKRHSPED PEATMTDQGP SKEKVPGISQ  
 AVQQDSATAA ETKEQEISQA MEQEGATAAE TEEQEISQAM EQEGATAAET EEQGHGGDTW  
 DYKSHVMTKF ABEEDVRRSF ENTAADWPEM QTLGAFDSD RWGFRPRTVV LHGKSGIGKS  
 ALARRIVLCW AQGGLYQGMF SYVFFLPVRE MQRKKESSVT EFISREWPD S QAPVTEIMSR  
 PERLLFIIDG FDDLGSVLNN DTKLCKDWA E KQPPFTLIRS LLRKVLLPES FLIVTVRDVG  
 TEKLLKSEVVS PRYLLVRGIS GEQRIHLLLE RGIGEHQKTQ GLRAIMNNRE LLDQCQVPAV  
 GSLICVALQL QDVVGESVAP FNQTLTGLHA AFVFHQLTPR GVVRRCLNLE ERVVLKRFCR  
 MAVEGVWNRK SVFDGDDLMV QGLGESELRA LFHMNILLPD SHCEEYTYFF HLSLQDFCAA  
 LYYVLEGLEI EPALCPLYVE KTKRSMELKQ AGFHIHSLWM KRFLFGLVSE DVRRPLEVLL  
 GCPVPLGVKQ KLLHWVSLG QQP NATTPGD TLD AFHCLFE TDQKEFVRLA LNSFQEVWLP  
 INQNLDLIAS SFCLQHCPYL RKIRVDVKG I FPRDESAREAC PVVPLWMRDK TLIEEQWEDF  
 CSMLGTHPHL RQDLGSSIL TERAMKTLCA KLRHPTCKIQ TLMFRNAQIT PGVQHLWRIV  
 MANRNLRLSLN LGGTHLKEED VRMACEALKH PKCLLESRL DCCGLTHACY LKISQILTTS  
 PSLKSLSLAG NKVTDQGVMP LSDALRVSQC ALQKLILEDG GITATGCQSL ASALVSNRSL  
 THLCLSNNSL GNEGVNLLCR SMRLPHCSLQ RLMLNQCHLD TAGCGFLALA LMGNLWTLHL  
 SLSMNPVEDN GVKLLCEVMR EPSCHLQDLE LVKCHLTAAC CESLSCVISR SRHLKSLDLT  
 DNALGDGGVA ALCEGLKQKN SVLTRLGLKA CGLTSDCCEA LSLALSCNRH LSTLNLVQNN  
 FSPKGMMLC SAFACPTSNL QIIGNDSEEN DVLRESALV LKLVTVSKNL SMTLRENLLY  
 LPKPYNTTRH RDSEEGIHGW TERLWKWQYP VQIRKLLLEV QLLKPRVID GSWHSFDEDD  
 RLDLQSQNS HSARQTYNLM ASQKSDPINP ATFRDLRSTA DGGTGHFHIG VPPVGCVRFS  
 DVPAFTCQVR DEVGILVHNS QKVQTHVSI SR

>NALP5/Py8.dna |GENSCAN\_predicted\_CDS\_1|6939\_bp  
 atgagtgcagtgatccaccctctgacacccccattcccttttcatcctcctccactcac  
 agttctcatattccgccttgacattctcttgcaccccggtcccatgtgaaaatggg  
 gctatctgtacatgagaaacgtgagccatgaggagctacaacggttcaagcagctcta  
 ctgactgagctcagtgactggcaccatgcccatcacctgggaccagggtcgagacagccagc  
 tgggcagaggtggttcctctcttgatagagcggttccctggacgacgcgcttgggatgtg  
 acttcgaacatctttgccattatgaactgtgataaaatgtgtgtgtgtagtccgcagagag  
 ataaatgccattctgcctaccttggaaaccagaggacttgaatgtgggagaaacacaggtg  
 aatctggaggaaggagaatctggtaaaatacggcggtataaatcgaatgtgatggaaaag

Forts. Fig. 1

tttttccccatatgggacattacgacttggcctggaaaccagagggacttcttctaccaa  
gggtgtacacagggcacgaggagtagtacttaccatgtctgcttctgccccaaaagaccccagggg  
agacagcccaagaccgtggccatacagggagctcctgggatcggaaaaacaatcctggcc  
aaaaagggtgatgtttgagtgggcccagaaacaagtctctacgccacacagcgctgggtgtgct  
ttctacttccatttgccaagaggtgaaccagacgacagaccagagcttctccgagctgatt  
gagcaaaagtggcctggatctcaggacctcgtgtcaaagattatgtccaaacccgaccaa  
cttctgctgctcttggatggctttgaggagctcacatctaccctcattgacagactggag  
gacctgagtgaagactggaggcagaaattgcctgggtctgtcctactgagcagtttgctg  
agcaaaacgatgcttccagaggccacgctactgatcatgataagatttacctcttggcag  
acatgcaagcccttgetgaaatgtccctctctcgttaacccttccgggggtttaatacgtg  
gaaaaaatcaagtatttccagatgtattttggacacacagaggagggagaccaagtcttg  
agtttcgccatggaaaacaccattctcttctccatgtgcgggtccctgtggtttgctgg  
atggtctgctctggtctgaaacagcaaatggagagaggaacaatctcacacagtcattg  
ccaaatgccacctctgtgttcgtccgggtatatttctagcttgtttcccaccagagctgag  
aacttttccagaaagatccaccaagcacaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac  
agcatgtggcacaggaaatgggtgttaggttaagaagatcttgaggaaagccaagctggat  
cagacgggagtcacgccttccctggcatgagtagtattcttcggagaattgcaggtgaggaa  
gaccactatgtctttaccctcgtgacttttcaggaaatttttgcggccttggtttatgtt  
ctctgtttcccaaaagactcaaaaattttcatgtgttgagccacgtgaatatccagcgc  
ctgatagcgagtcacagaggaaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttattc  
gggtttctgaacgaggcctgcgcttcggccgtggaacagtcattccaatgcaaggtgtct  
ttcggtaataagaggaactgtgaaagtcatacctctgttgcaataatgtgaccacct  
tctccgggcagtggggtcccgagttattctactgtctgcatgaaatccgggaggaagcc  
tttgtaagccaagccctaaatgattatcataaagtgtgtcttgagaattggcaacaacaaa  
gaagtccaagtgtctgcttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcatgaggtggaactg  
accgtcaccctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccatcctggtct  
gacctaaagcgtgtgtaagtagcaccatgttgaaacaggacttaatcgggtgttttgacgggg  
aaccagcatctgagatacttggaataacaacatgtggaagtggagtccaaagctgtgaag  
cttctatgcagggtgtgagatccccccgggtgcgctctgcagtgctcagggttggaagac  
tgcttggccacccctagaatttggactgatcttggcaataatcttcaaggtaacgggcat  
ctaaagactctcatactaagaaaaaactccctggagaactgtggggcgattacctgtct  
gtggccagctggagaggctgtccagagtaagatgctgaccacctgagcttggcagaa  
aacgccttgaaagatgaaggggccaagcatatttggaaatgccctgccacacctgagatgt  
cctctgcagaggctgggtactgagaaagtgtgacttgaccttaattgtgtcaggatatg  
atctctgcgctctgtaaaaataaaacccctgaaaagtcttgacctaaagttaaatagcctg  
aaggatgatggggtgatcctgtgtgtgagggcctgaagaacctgactgtacattacag  
atcctggagctggaaaactgcctgttcacctccatctgctgccagggccatggcttccatg  
ctccgcaaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgagattggagctcat  
gggtattctgacctgtgtgcaggccttctcaagccaaaagaagagagaagaggtcattttc  
actattcacaatagccaagatttggaaacacctaagtgtccatcaacagatgaatggata  
aagaaaatgtggtacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag  
tgtagaacaatgggtatcatagaaacagcacactgggtgtcagggtcctacttgctctata  
ttaccaagaatccacttttcccccaaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa  
ggagacaaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgtctctatgagctagac  
aaggaagaatttcagacattcaaggaattactaaagaagaaatcttcagaatcgaccaca  
tgctctattccacagtttgaaatcgagaatgccaacgtggaatgtctggcactcctcttg  
catgagttatttgagcatcgctggcctgggctacgtccattagcatctttgaaaacatg  
aacctgcgaaccctctcggagaaggcacgggatgacatgaaaagacattcaccagaagat  
cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtgccaggaatttcacaa  
gctgtgcaacaagatagtgccacagctgcagagacaaaagaacaagaatttcacaagct  
atggaaacaagaagggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaatttcacaagctatg  
gaacaagaagggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggacatggaggtgacacatgg  
gactacaagagtcacgtgatgaccaaattcgtctgaggaggaggatgtacgtcgtagtttt  
gaaaacactgctgctgactggcgggaaatgcaaacgttggtgtggtgttttgattcagac  
cgggtggggttccggcctcgacgggtggttctgcacgggaaagtgcaggaattgggaaatcg  
gctctagccagaaggatcgtgctgtgctgggcgcaagggtggactctaccaggggaatgttc  
tctacgtcttcttctctcccttagagagatgcagcgggaagaaggagagcagtgtcaca  
gagttcatctccaggagtgggccagactccaggctccgggtgacggagatcatgtcccg



Forts. Fig. 1

ccagaaaggctgttgttcatcattgacgggttctgatgacctgggctctgtcctcaacaat  
gacacaaagctctgcaaagactgggctgagaagcagcctccgttcacctcatacgcagt  
ctgctgaggaaggctcctgctccctgagtccttctctgatcgtcaccgtcagagacgtgggc  
acagagaagctcaagtacagaggtcgtgtctccccgttacctgttagttagaggaatctcc  
ggggaacaaagaatccacttgctccttgagcgcgggattgggtgagcatcagaagacacaa  
gggttgctgctgcatcatgaacaaccgtgagctgctcgaccagtgccaggtgccgcgctg  
ggctctctcatctgctggccctgcagctgcaggacgtgggtgggggagagcgtcgccccc  
ttcaaccaaacgctcacaggcctgcacgcgcgttttgtgttccatcagctcaccctcga  
ggcgtggtccggcgtgtctcaatctggaggaaagagttgtcctgaagcgttctgcccgt  
atggctgtggagggtgtggaataggaagtcagtggttgacgggtgacgacctcatgggt  
caaggactcggggagctctgagctccgtgctctgtttcacatgaacatccttctcccagac  
agccactgtgaggagtactacaccttcttccacctcagctctccaggacttctgtgcccgc  
ttgtactacgtgttagagggcctggaatcgagccagctctctgccctctgtacgttgag  
aagacaaagaggtccatggagcttaaacaggcaggttccatattccactcgctttggatg  
aagcgtttctgtttggcctcgtgagcgaagacgttaaggaggccactggaggtcctgctg  
ggctgtcccgttcccctgggggtgaagcagaagcttctgcactgggtctctctgttgggt  
cagcagcctaatagccaccaccccaggagacacctggacgccttccactgtctttctcgag  
actcaagacaaagagttgttgccttgccattaaacagcttccaagaagtgtggcttccg  
attaaccagaacctggacttgatagcatcttcttctgctccagcactgtccgtatttg  
cggaaaaatcgggtggatgtcaaagggatcttcccaagagatgagtcgctgaggcatgt  
cctgtggtccctctatggatgcgggataagaccctcattgaggagcagtggggaagatttc  
tgctccatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg  
acagacggggcctgaagaccctgtgtgccaagctgaggcatcccacctgcaagatcacag  
acctgtgttttagaaatgcacagattaccctgggtgtgacgacctctggagaatcgtc  
atggccaaccgtaacctaaagatccctcaacttgggaggcaccacctgaaggaagaggat  
gtaaggatggcgtgtgaagccttaaaacacccaaaatgtttgttggagtcctttgaggctg  
gattgtgtggattgacccatgcctgttacctgaagatctcccaaatccttacgacctcc  
cccagcctgaaatctctgagcctggcaggaaacaaggtgacagaccagggaagtaatgcct  
ctcagtgatgccttgagagtcctccagtgccctcgcagaagctgatactggaggactgt  
ggcatcacagccacgggttgccagagtcctggcctcagccctcgtcagcaaccggagcttg  
acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaaggtgtaaatctactgtgtcga  
tccatgaggcttcccactgtagtctgcagaggtgatgctgaatcagtgccacctggac  
acggctggctgtggttttcttgacttgcgcttatgggtaactcatggctgacgcacctg  
agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgagaggtcatgaga  
gaacctcttgtcatctccaggacctggagttggtaaagtgtcatctcaccgcgcgctgc  
tgtgagagtcctgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg  
gacaatgccctgggtgacgggtggggttgctgcactgtgaggggactgaagcaaaagaac  
agtggttctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgatgtgtgaggga  
ctctccttggcccttctcctgcaaccggcatctgaccagctctaaacctgggtgcagaataac  
ttcagtcccaaaggaatgatgaagctgtgttcggccttgcctgtcccacgtctaactta  
cagataattggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttcgagaatctgctctagtagtt  
ttgcttaaagtcactgtttccaagaacctatcaatgacattaaggggagaacttactgtac  
ctcccaaacctataacacgacccggcacagagactctgaggaaggaattcatggatgg  
actgaaaggctgtggaaatggcagtagcctgtgcaataaggaagctgctggagggaagt  
cagctactcaagccccgagtcgtaattgacggtagttggcattcttttgatgaagatgac  
cgattggatcttcaaagccagcaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg  
gcacacagaagtcagatcccatcaacctgccacattccgtttggatagaagcactgct  
gacgggtgggacccggccacttccacatcgggggtccgcctgtgggctgtagggtgttcagt  
gacgtccctgcttttacctgccaggtaagagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc  
caaaagggtgcagacaacccacgtgtctatcagcagatga

.....

### 1.9 >NALP6/PY9

MDQPEAPCSSTGPRLAVARELLLALEELSQEQLKRFHKLKRDVGPDRSIPWGRLERADAVDLAEQLAQF  
YGPEPALEVARKTLKRADARDVAAQLQERRLQRLGLSGSGLLSVSEYKKKYREHVLQLHARVKERNARSVK

Forts. Fig. 1

ITKRFTKLLIAPESAPEEALGPAEEPEPGRARRSDTHTFNRLFRRDEEGRRPLTVVLQGPAGIGKTMMAK  
KILYDWAAGKLYQGQVDFAFFMPCGELLERPGTRSLADLILDQCPDRGAPVPMQLAQPOQLLFILDGADDEL  
PALGGPEAAPCTDPFEAASGARVLGGLLSKALLPTALLLVTTAAAPGRLQGRILCSPOCAEVRGFSKDKK  
KYFYKFFRDERRAERAYRFVKENETLFCFVFPVCWIVCTVLRQQLLELGRDLSRTSKTTTSVYLLFITSV  
LSSAPVADGPRLQGDRLNRLCRLAREGLVLRRAQFAEKELEQLERLGRSKVQTLFLSKKELPGVLETEVYQF  
IDQSFQEFLLAALSYLEDDGGVPRTAAGGVGTLRLGDAQPHSHLVLTTRFLFGLLSAERMMDIERHFGCMVS  
ERVKQEARLWVQGGQGPCGVAPEVTEGAKGLEDTEEPPEEEEGEENYPLELLYCLYETQEDAFVRQALC  
RFPELALQVRVFCRMDVAVLSCVRRCCPAGQALRLISCLVAAQEKKKKSLGKRLQASLGGGSWLGTQLAP  
EVPFRPPCCDICPTPPDPRLQKAFARVPLNIAPIQPLPRGLASVERMNVTVLAGAGPGDPKTHAMTDP  
LCHLSSLTLSHCKLPDAVCRDLSEALRAAPALTELGLLHNLSEAGLRMLSEGLAWPQCRVQTVRVQLPDP  
QRGLQYLVGMLRQSPALITLTLGSCQLPAPMVTYLCAVLQHQGCGQLQTLSSLPSDPTPSSFSGRCREPGR  
RLGLESRWPRSAPEPSGDSEARTQVEAAGGAGGRRRGREPPARGPHQPPRDAARGPGSSFAHSGRFVQG  
TPGPRTRPRLPAGTEGSRGRGRESTSRPRARSDRPRRGTAPASQRPFGPSGRGPRTFLVARQPGSS  
FLPALAWSRGTVPTLAPGDRVGLRPLRPSSMEDAGEDPTTFAHSLPSDPRLLATVTNAYLGRVFDHT  
LHVSQVYNGAGDTHRAMLPSPNLVRLEAPAGMGEQLTETFALDTNTGSFLHTLEGPRFRASQCIYAHRTL  
PHVLAFRVSIARLAPSGSPITLLLRSAFSPESPDLHLHQGPDFQGARYLYGHITLTPEQPGGPQEVHMLWT  
PAPPDLTLGEGEEARTWDFLTAVGGSQAEQAQCLTEALQLQARGALYTAHAQAWAQLWVECGLDVVGPIQL  
RQALRGSLLYLLSALPOKAPGYICHGLSPGGLSNGSREECYWHVFWDDLMWFPSILMFHPEAARAILLE  
YRIRTLGALENAQNLGYQAKFAWESADSGLEVPEDITYGVQEVHVNAGAVLAFELYHTTQDLQLFRE  
GGWDVVRAVAEFWCSRVEWSPREEKYHLRGVMSPEYHSGVMNSVYTNVLVQNSLRFAAALAQDLGLPIPS  
QWLAVADKIKVPFDVEQNFHPEFDGYEPDPRVCPGTSSQRHLFPVGEVVKQADVLLGYFPVPSLSPDVR  
KNLEIYEAVTSPQGPAMTWSMFAVGWMLKDAVRARGLLDRSFANMAEPFKVWTENADGSGAVNFLTGMCG  
FLQAVVFGCTGFRVTRAGVTDFVCLSGISRVSVGIFYQGNKLNFSFSEDSVTVEVTARAGPWAPHLEA  
LWPSQSRLSLLPGHKVSFPRASGRIQMSPPKLPGSSSEFFGRTFSDVRDPLQSPWLVTGLSSSPTESLTV  
DPASE

&gt;NALP6/PY9.dna

ATGGACCAGCCAGAGGCCCTGCTCCAGCACGGGGCCGCGCTCGCGGTGGCCCGCGAGCTGCTCCTGGC.  
TGCGCTGGAGGAAGCTGAGCCAAGAGCAGCTGAAGCGCTTCGCCACAAGCTGCGGACGTGGGCCCCGACG  
GACGCAGCATCCCGTGGGGGGCGGCTGGAGCGCGCGGACGCGCTGGACCTCGCGGAGCAGCTGGCCAGTTT.  
TACGGCCCGGAGCTGCCCTGGAGGTGGCCCGCAAGACCTCAAGAGGGCGGACGCGCGGACGTGGCGGC  
GCAGCTCCAGGAGCGCGGCTGCAGCGGCTCGGCTCGGCTCGGGACGCTGCTCTCCGTGTCGAGTACA  
AGAAGAAGTACCGGGAGCAGTGCTGCAGCTGCACGCTCGGGTGAAGGAGAGGAACGCCCGCTCCGTGAAG  
ATCACCAGCGCTTACCAAGCTGCTCATCGCGCCGAGAGCGCGCCCCGAGGAGGCGCTGGGCCCCG  
GGAAGAGCCTGAGCCGGGGCGCGCGCGCTCGGACACGCACACTTCAACCGCTCTTCCGCGCGGACG  
AGGAGGGCCGGCGCGCTGACCGTGGTGCTGCAGGGCCCGCGGGCATCGGCAAGACCATGGCGGCCAAA  
AAGATCCTGTACGACTGGGCGGCGGCAAGCTGTACCAAGGCGAGGTGGACTTCGCTCTTCAAGCTG  
CGGCGAGCTGCTGGAGAGGCGGGCACGCGCAGCCTGGCTGACCTGATCCTGGACCAAGTGCCCGACCGG  
GCGCGCCGCTGCCGAGATGCTGGCCAGCGCGAGCGCTGCTCTTCACTCTGGACGGCGCGGACGAGCTG  
CCGGCGCTGGGGGGCCCCGAGGCGCGCCCTGCACAGACCCCTTCGAGGCGGCGAGCGGCGCGCGGTGCT  
AGGCGGGCTGCTGAGCAAGGCGCTGCTGCCACGGCCCTCCTGCTGGTGACACGCGCGCCGCCCCCG  
GGAGGCTGCAGGGCCGCTGTGTTCCCGCAGTGCGCGGAGGTGCGCGGCTTCTCCGACAAGGACAAGAAG  
AAGTATTTCTACAAGTCTTCCGGGATGAGAGGAGGGCCGAGCGCGCTACCGCTTCTGTAAGGAGAACGA  
GACGCTGTTCGCGCTGTGCTTCTGTCCTTCTGTCGCTGGATCGTGTGCACCGTGTGCGCCAGCAGCTGG  
AGCTCGGTGCGGACCTGTGCGCACGTCCAAGACCACACGTGAGTGATCTGCTTTTCACTACCAAGCTT  
CTGAGCTCGGCTCCGGTAGCCGACGGGCCCGGTTCAGGGCGACCTGCGCAATCTGTGCCGCTGGCCCCG  
CGAGGGCGTCTCGGACGCGAGGGCGCAGTTTGGCTGAGAGGAACTGGAGCACTGGAGCTTCTGTGCTCCA  
AAGTGACAGCCTGTTTCTCAGCAAAAAGGAGCTGCCGGGCGTGCTGGAGACAGAGGTACCTACCAAGTTC  
ATCGACCAAGCTTCCAGGAGTTCTCGCGGCACTGTCTTACCTGCTGGAGGACGGCGGGTGCCAGGAC  
CGCGCTGGCGGCGTTGGGACACTCTGCTGGTGAGCGCCAGCGCACAGCCACTTGGTGCTCAACACGC  
GCTTCTCTTCCGAGCTGTGAGCGCGGATGCGGACATCGAGCGCCACTTGGTGCTCAACACGC  
GAGCGTGTGAAGCAGGAGGCCCTGCGGTGGGTGCGGACAGGACAGGGCTGCCCGGAGTGCCCGACCA  
GGTGACCGAGGGGGCCAAAGGGCTCGAGGACACCGAAGAGCCAGAGGAGGAGGAGGAGGGAGAGGCCCA  
ACTACCCACTGAGTGTGCTGTACTGCTGTACGAGACGAGGAGGACGCGTTTGTGCGCCAAGCCCTGTGC  
CGGTTCCCGGAGCTGGCGCTGCAGCGAGTGCGCTTCTGCGCATGGACGTGGCTGTTCTGAGCTACTGCGT  
GAGGTGCTGCCCTGCTGAGACAGGCACTGCGGCTGATCAGCTGCAGATTGGTTGCTGCGCAGGAGAAGAAG  
AGAAGAGCCTGGGGAAGCGGCTCCAGGCCAGCCTGGGTGGCGGACGCTGGCTGGGGACCCAACTGGCTCCA



Ports. Fig. 1

GAAGTACCCCTTTGACACCCCTGCTGTGACATCTGCCCCACACCTCCACCAGACCCCTCGGCTCCTCCAGGG  
CAAGGCTTTTGCCAGAGTTCTTTGAATATAGCTCCAATTAGCCCTGCCCCAGGGGCTTGGCATCTGTTG  
AGAGGATGAATGTACGGTGTGGCAGGGGCTGGGCTGGGGACCCAAAGACCCATGCAATGACTGACCCA  
CTGTGCCATCTGAGCAGCCTCACGCTGTCCCACCTGCAAACTCCCTGACGCGGTCTGCGGAGACCTTTCTGA  
GGCCCTGAGGGCAGCCCCGCACTGACGGAGCTGGGCTCCTCCACAACAGGCTCAGTGAGGCAGGACTGC  
GTATGCTGAGTGAGGGCCTAGCCTGGCCGAGTGAGGGTGCAGACGGTCAGGGTACAGCTGCCTGACCCC  
CAGCGAGGGCTCCAGTACCTGGTGGGTATGCTTCGGCAGAGCCCTGCCCTGACCACTCTGGATCTCAGCGG  
CTGCCAACTGCCCGCCCCCATGGTGACCTACCTGTGTGAGTCTTGCAGCACCAGGGATGCGGCTGCAGA  
CCCTCAGCCTCTCGCTTCCTTCTGACCCGACCCGAGTTCTTTCTCCGAGCGGTGTGAGAAACCCGGGCGC  
CGGCTGGGGCTGGAGTCTCGCTGGCCTCGGAGCGCCCCGAGCCCTCGGGCGACAGCGAGGCGAGGACCCA  
GGTGGAGGCGGCGGGGGCGGGGCGGAGGAGGAGCGCGGAGGGAACCCCGGCCCGGGGCCCCACC  
CACAGCCGCCCCGGGACGCACTCGGGGTCCAGGCTCGAGCTTTGCTCACTCAGGGCGCTTCGTGAGGGA  
ACGCCAGCCCCCGGACGCGACCCACGCGGCCGCTGCCAGCGGGGACCGAGGGGAGCCGGGGCCGCGGCCG  
CGAGTCCAGCTCCCGCCCCGGGCGGCCGACGACCGCCCCCGCCGAGGACCGCCCCCGCTCCC  
AGCGACCGCCCCGGGCCCCCGGGGCGGGGACCGCGACCTTCTGGTGGCGCGCAGCCGGGCGGCTCCTCC  
TTCCTCCCGGCCCTGGCGTGGAGCAGAGGGACACAGGTTCCACGCTGGCGCCCCGGCGACCGGGTGGGGCT  
GGGGCGGCTCAGGCCCAGCAGCTCCATGGAGGACCGCGCGAGGACCCACACGTTTGCTGCCCACTCTC  
TGCCAGTGACCCCGTCTCTTGGCCACTGTGACCAACGCATACCTGGGCACACGAGTGTTCACGACACG  
CTGACGCTGAGCGCGGTGTACAATGGGGCTGGCGGGGACACGACCGGGCCATGCTGCCAGCCCCCTCAA  
CTGCCGGCTGGAGGCCCCCTGCAGGGATGGGGAGCAGCTGACCGAGACCTTCGCCCTGGACACCAACACAG  
GCTCCTTTCTTCAACCCCTGGAGGGCCCCCGCTTCGGGCTCCAGTGCATCTATGCGCATCGCACGCTG  
CCCCACGTGCTGGCTTTCCGAGTGTCCATCGCCCCGCTGGCCCCGGGGAGCGGGCCCATCACGCTGCTCCT  
GCGGTGAGCCTTCTCCCCAGAAAGCCAGACCTGGACCTGCATCAGGGTCCCTGACTTCCAGGGAGCCCGGT  
ACCTGTATGGCCAACCCCTCACCCCTGAGCAGCCCGGGGGCCACAGCAAGAGGTACACGTGTGGACA  
CCAGCACCCCCAGACCTGACCCCTGGGGAAGGTGAGGAGGCTAGGACGTGGGACTTCTGACAGCAGTGGG  
CGGCAGCCAGGCTGAGGCTCAGGCCTGCCTCACTGAGGCCCTGCAGCTGCAGGCCAGGGGAGCTCTGTATA  
CGGCTCACGCACAGGCCTGGGCCCAGCTCTGGGTAGAATGTGGCTTGGACGTGGTGGGCCCCCTGCAGCTG  
CGCCAGGCCCTGCGTGGCTCCCTCTACTACCTGCTCAGTGCCCTGCCCCAGCCCAAGGCCCCAGGATACAT  
CTGCCATGGCCCTCAGTCTGGGGCCCTCTCCAATGGGAGCCGCTGAGGAATGCTACTGGGGCCACGTCTTCT  
GGGACCAGGACCTCTGGATGTTCCCGAGTATCTGATGTTCCACCCAGAAGCCGCCAGGGCCATCCTGGAG  
TACCGCATCCGCAAGCTGGACGGGGCCCTGGAGAAGCCCCAGAACCTGGGCTACCGAGGAGCCAAGTTTGC  
CTGGGAGAGTGACAGTCCGGCCTAGAGGTTTGCCCTGAGGACATTTACGAGTCCAGGAGGTCCACGTCA  
ACGGGGCCGTGGTGTGGCCTTCGAGCTGTACTACCATAACCCAGGACCTGCAGCTATTTCCAGAGGCT  
GGTGGCTGGGACGTGGTTCAGGGCTGTGGCCGAGTTTGGTGCACTCGTGTGAGTGAGGCCCCAGGGAGGA  
AAAGTACCACCTGAGGGGAGTCATGTCCCCGACGAGTACCATTAGGGGTCAACAACCTCTGTGTACACCA  
ACGTCTGGTCCAGAACAGCCTGCGCTTTGCTGTGCCCCGAGGACCTGGGTCTTCCCATCCCCAGC  
CAGTGGCTGGCGGTGGCTGACAAGATCAAGGTACCTTTGACGTGGAGCAGAACTTCCACCCGAGTTTGA  
TGGGTATGAGCCTGACCCCTCGAGTCTGTCTGGAACACCTTCCAGTCAGCGGCACCTCCCTGTAGGAGAGG  
TGGTGAAGCAGGCAGACGTCTGTCTCTGGGATACCCAGTCCCCTTCTCCCTGAGTCTGATGTTTCGAGG  
AAAAATCTGGAGATTTACGAGGCTGTGACGTCCCCCAGGGCCCCGCCATGACCTGGAGCATGTTTGCTGT  
GGGCTGGATGGAGCTGAAGGACGCACTGCGGGCCCGGGGCTCCTGGACAGGAGCTTTGCCAATAGGCTG  
AACCCTTCAAGGTGTGGACGGAGAATGCAGACGGGTGAGGCGCTGTGAACCTTCTGACAGGCATGGGGGGC  
TTCCTGCAGGCGGTGGTCTTCGGGTGCACGGGTTTCCAGGTCACCCGAGCGGTGTGACCTTTGACCCCTGT  
GTGTCTGTGCGGGATCTCCAGAGTGAGCGTCTCCGCGCATCTTCTACAGGGGAACAAGCTCAACTTCTCTT  
TTTCCGAGGACTCCGTGACCGTGGAGGTACAGCTCGAGCAGGGCCCTGGGCTCCTCACCTGGAGGCTGAG  
CTGTGGCCATCCAGTCCCGGCTCTCCCTGTTGCCAGGACACAAGGTCTCCTTTCCCGCTCGGCTGGCCG  
GATACAAATGTACCCCCGAAGCTGCCTGGAAGTTCCAGCTCCGAGTTCCTGGGAGGACTTTTTCAGATG  
TTAGGGACCCGCTCCAGAGCCCCCTCTGGGTACCCCTGGGTTCTCCAGCCCCACCGAGTCACTCACTGTG  
GACCCCTGCCTCTGAATAA

1.10 >PY10  
MASSAELDFNLQALLEQLSQDELKFKSLIRTISLGKELQTPQTEVDKANGKQLVEIFTSHSCSYWAGMA  
AIQVFEEKMNRTHLSGRADEHCVMPPP  
>PY10.dna

Forts. Fig. 1

ATGGCATCTTCTGCAGAGCTGGACTTCAACCTGCAGGCTCTTCTGGAGCAGCTCAGCCAGGATGAGTTGAG  
 CAAGTTCAAGTCTCTGATCAGAACAAATCTCCCTGGGAAAGGAGCTACAGACCGTCCCCAGACAGAGGTAG  
 ACAAGGCTAATGGGAAGCAACTGGTAGAAATCTTACCAGCCACTCCTGCAGCTACTGGGCAGGGATGGCA  
 GCCATCCAGGTCTTTGAAAAGATGAATCGAACGCATCTGTCTGGGAGAGCTGATGAACACTGTGTGATGCC  
 CCCACCTTAA

>NALP7/Py11

1.11

FFSLNLRSH TSTMTSPQLE WTLQTLLEQL NEDELKSFKS LLWAFPLEDV LQKTPWSEVE  
 EADGKKLAEI LVNTSSENWI RNATVNILEE MNLTELCKMA KAEMMEDGQV QEIDNPPELGD  
 AEEDSELAKP GEKEGWRNSM EKQSLVWKNT FWQGDIDNFH DDVTLRNQRF IPFLNPRTPR  
 KLTPYTVVLH GPAGVGKTTL AKKCMLDWTD CNLSPTLRYA FYLSCKELSR MGPCSFANELI  
 SKDWPELQDD IPSILAQAQR ILFVVDGLDE LKVPPGALIQ DICGDWEKKK PVPVLLGSLL  
 KRKMLPRAAL LVTTRPRALR DLQLLAQPI YIRVEGFLEE DRRAYFLRHF GDEDQAMRAF  
 ELMRSNAALF QLGSAPAVCW IVCTTLKLQM EKGEDPVPTC LTRTGLFLRF LCSRFPQGAQ  
 LRGAIRTLISL LAAQGLWAQM SVFHREDLER LGVQESDLRL FLDGDILRQD RVSKGCYSFI  
 HLSFQOFLTA LFYALEKEEE EDRDGHAWDI GDVQKLLSGE ERLKNPDLIQ VGHFLFGLAN  
 EKRAKELEAT FGCRMSPDIK QELLQCKAHL HANKPLSVTD LKEVLGCLYE SQEELAKVV  
 VAPFKEISIH LINTSEVMHC SFSLKHCQDL QKLSLQVAKG VFLENYMDFE LDIEFESSNS  
 NLKFLEVQKS FLSDSSVRIL CDHVTRSTCH LQKVEIKNVT PDTAYRDFCL AFIGKKTILTH  
 LTLAGHIEWE RTMMLMLCDL LRNHKCNLQY LRLGGHCATP EQWAEFFYVL KANQSLKHLR  
 LSAVLLDEG AMLLYKTMT PKHFLQMLSL ENCRLEASC KDAAVLVVS KKLTHLCLAK  
 NPIGDTGVK LCEGLSYDC KLQTLVLQCC SITKLGCERYL SEALQEACSL TNLDLSINQI  
 ARGWLILCQA LENPNCNLKH LRLWSCSLMP FYCQHLGSAL LSNQKLETLD LGQNHILWKS  
 IIKLFGVLRQ RTGSLKILRL KTYETNLEIK KLEEVKEKN PKLTIDCNAS GATAPPCCDF  
 FC

>NALP7/Py11.cdna

ttcttcagccttaacctaaggtctcactactcggagcactatgacatcgccccagctagag  
 tggactctgcagacccttctggagcagctgaacgaggatgaattaaagagtttcaaattcc  
 cttttatgggcttttccctcgaagacgtgctacagaagaccccatgggtctgaggtggaa  
 gaggtctgatggcaagaaactggcagaaaattctgggtcaacacctcctcagaaaattggata  
 aggaatgagactgtgaacatcttgggaagagatgaatctcacggaattgtgtaagatggca  
 aaggctgagatgatggaggacggacaggtgcaagaaatagataatcctgagctgggagat  
 gcagaagaagactcggagttagcaaaagccaggtgaaaagggaaggatggagaaattcaatg  
 gagaaacaatctttgggtctggaagaacaccttttggcaaggagacattgacaatttccat  
 gacgacgtcactctgagaaaccaacgggttcattccattcttgaatcccagaacacccagg  
 aagctaacaccttacacgggtggtgctgcacggccccgcaggcgtggggaaaaccacgtg  
 gccaaaaagtgtatgctggactggacagactgcaacctcagcccgacgctcagatacgcg  
 ttctacctcagctgcaaggagctcagccgcagtgggccctgagttttgagagctgac  
 tccaaagactggcctgaattgcaggatgacattccaagcatcctagcccaagcacagaga  
 atcctgttcgtgggtcgatggccttgatgagctgaaagtcccacctggggcgctgatccag  
 gacatctgcggggactgggagaagaagaagccgggtgcccgtcctcctggggagtgtgctg  
 aagaggaagatgttaccagggcagccttgcgtgggtcaccacgcggcccagggcactgagg  
 gacctccagctcctggcgacgagccgatctacataagggtggagggttctctggaggag  
 gacaggagggcctatttctcagacactttggagacgaggaccaagccatgcgtgccttt  
 gagctaattgaggagcaacgcggccctgttccagctgggctcggccccgcgggtgtgctgg  
 attgtgtgcacgactctgaagctgcagatggagaagggggaggacccgggtccccacctgc  
 ctccccgcacggggctgttctcgtgttctcctcgcagccggttcccgcagggcgacag  
 ctgcggggcgctgcggacgctgagcctcctggccgcgcaggccctgtggggcgagatg  
 tccgtgttccaccgagaggacctggaaaggctcggggtgcaggagtcgacctccgtctg  
 ttcttgagcggagacatcctccgccaggacagagtctccaaaggctgctactccttcac  
 cacctcagcttccagcagtttctcactgccctgttctacgcctggagaaggaggaggag  
 gaggacaggggacgccacgcctgggacattggggacgtacagaagctgcttccggagaa  
 gaaagactcaagaaccccgacctgattcaagtaggacacttctattcggcctcgtaac  
 gagaagagagccaaggagttggaggccacttttggctgccggatgtcaccggacatcaa  
 caggaattgctgcaatgcaaagcacatctcatgcaataagcccttatccgtgaccgac  
 ctgaaggaggttctgggctgctgtatgagttctcaggaggaggagctggcgagggtggtg  
 gtggccccgttcaaggaaatttctattcacctgacaaacttctgaagtgtatgcatgtg  
 tccttcagcctgaagcattgtcaagacttgacagaaactcactgcaggtagcaagggtg  
 gtgttcttgagaattacatggattttgaactggacattgaatttgaaagctcaaacagc

Forts. Fig. 1

```

aacctcaagtttctggaagtgaacaaagcttcctgagtgactcttctgtgaggattctt
tgtgaccacgtaacccgtagcacctgtcatctgcagaaagtgagattaaaaacgtcacc
cctgacaccgcgtaccgggacttctgtcttctgtttcattgggaagaagaccctcacgcac
ctgaccctggcagggcacatcgagtggaacgcacgatgatgctgtgtgtgacctg
ctcagaaatcataaatgcaacctgcagtagctgaggttgggaggtcactgtgccaccccg
gagcagtgaggctgaattctctatgtcctcaaagccaaccagtcctgaagcacctgct
ctctcagccaatgtgctcctggatgaggggtgccatgttctgtgtacaagaccatgacacgc
ccaaaacacttcctgcagatgtgtcgttggaaaactgtcgtcttacagaagccagtgc
aaggacctgtgctgtcttgggtgtcagcaagaagctgacacacctgtgcttggccaag
aaccctcattggggatacaggggtgaagtttctgtgtgagggcttgagttacctgtattgt
aaactgcagaccttgggtgttacagcaatgcagcataaccaagcttggctgtagatatctc
tcagaggcgctccaagaagcctgcagcctcacaacactggacttgagtatcaaccagata
gctcgtggatttgtgattctctgtcaggcattagagaatccaaactgtaacctaaaacac
ctacgcctctggagctgtcctcctcatttctattgtcagcatcttggtatctgctctc
ctcagcaatcagaagcttgaaactctggacctgggcccagaatcatttgtggaagagtggc
ataattaagctcttgggggttctaagacaaagaactggatccttgaagatactcaggttg
aagacctatgaaactaatttggaaatcaagaagctgttggaggaagtgaagaaaagaat
cccaagctgactattgattgcaatgcttccggggcaacggcacctccgtgctgtgacttt
ttttgctga

```

## 1.12 &gt;NALP8/Py12

```

MSDVNPPSDT PIPFSSSSSTH SSHILPWTFS CYPGSPCENG VMLYMRNVSH EELQRFKQLL
LTELSTGTMP ITWDQVETAS WAEVVHLLIE RFPGRRAWDV TSNIFAIMNC DKMCVLVRRE
INAILPTLEP EDLNVGETQV NLEEGESGKI RRYKSNVMEK FFPIWDITTW PGNQRDFFYQ
GVHRHEEYLP CLLLPKRPQG RQPKTVAIQG APGIGKTILA KKVMFEWARN KFYAHKRWCA
FYFHCQEVNQ TTDQSFSCLI EQKWPGSODL VSKIMSKPDQ LLLLLLDGFEE LTSTLIDRLE
DLSIEDWRQKL PGSVLLSSLL SKTMLPEATL LIMIRFTSWQ TCKPLLKCPK LVTPLPGFNTM
EKIKYFQMYF GHTEEGDQVL SFAMENTILF SMCVRPVVCW MVCSGLKQQM ERGNLTLQSC
PNATSVFVRY ISSLPFTRA E NFSRKIHQAQ LEGLCHLAAD SMWHRKWVLG KEDLEBAKLD
QTGVTAFGLM SILRRIAGEE DHYVFTLVTF QEFFAALFYV LCFPQRLKNF HVLSHVNIQR
LIASPRGSKS YLSHMLFLF GFLNEACASA VEQSFQCKVS FGNKRKLLKV IPLLHKCDPP
SPGSGVPQLF YCLHEIREEA FVSQALNDYH KVVLRIGNNK EVQVSAFCLK RCQYLHEVEL
TVTILNFMNVW KLSSSSHPGS E

```

## &gt;NALP8/Py12---Py8.dna

```

gaaaaaatcaagttttccagatgtattttggacacacagaggaggagaccaagtcttg
agtttcgccatggaaaacaccattctcttctccatgtgccgggtccctgtggtttgctgg
atggtctgctctggtctgaaacagcaaatggagagaggaaacaatctcacacagtcatgt
ccaaatgccacctctgtgttcgtccggtatatttctagcttgtttccaccagagctgag
aactttccagaaaagatccaccaagcacaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac
agcatgtggcacaggaaatgggtgttaggtaaagaagatcttgaggaagccaagctggat
cagacgggagtcaccgccttccttggcatgagtttcttcggagaattgcaggtgaggaa
gaccactatgtctttaccctcgtgacttttcaggaatttttggggccttgttttatgtt
ctctgtttcccaaaaagactcaaaaattttcatgtgttgagccacgtgaatatccagcgc
ctgatagcagagtcacagaggaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttattc
gggtttctgaacgaggcctgcgcttcggccgtggaacagtcattccaatgcaaggtgtct
ttcggtaataagaggaaactgctgaaagtcatacctctgttgcataaatgtgaccacct
tctccgggcagtggggtcccgagttattctactgtctgcatgaaatccgggaggaagcc
tttgtaagccaagccctaaatgattatcataaagttgtcttgagaattggcaacaacaaa
gaagttcaagtgtctgtcttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcatgaggtggaactg
accgtcaccctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccattcctggtct
gacctaaaggcgtgtgaatagcaccatgttgaaccaggacttaatcgggtgttttgacgggg
aaccagcatctgagatacttggaaatacaacatgtggaagtgaggtccaaagctgtgaag
cttctatgcaggggtgctgagatcccccggtgccgtctgcagtgctcaggttggagac
tgcttggccacccctagaatttggactgatcttggcaataatcttcaaggtaacgggcat
ctaaagactctcataactaagaaaaaactccctggagaactgtggggcgattacctgtct
gtggcccagctggagaggctgtcgcagagtaagatgctgaccacctgagcttggcagaa

```

Forks. Fig. 1

aacgccttgaaagatgaaggggccaagcatatttggaaatgccctgccacacctgagatgt  
cctctgcagaggctgggtactgagaaagtgtgacttgaccttaattgctgtcaggatatg  
atctctgcgctctgtaaaaataaaaccctgaaaagtcttgacctaatgttttaatagcctg  
aaggatgatgggggtgatcctgctgtgtgaggccctgaagaacctgactgtacattacag  
atcctggagctggaaaactgcctgttcacctccatctgctgccaggccatggcttccatg  
ctccgcaaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgagattggagctctat  
gggtattctgacctgtgtgcgaggccttctcaagccaaaagaagagagaagaggctcatttct  
actattcacaatagccaagatttggaaagcacctaagtgtccatcaacagatgaatggata  
aagaaaatgtggtacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag  
tgtagaacaatgggtatcatagaaaacagcacactgggtgctcaggctcctactgtctctata  
ttaccaagaatccacttttcccccaaaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa  
ggagacaaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgtctctatgagctagac  
aaggaagaatttcagacattcaaggaattactaaagaagaatcttcagaatcgaccaca  
tgctctattccacagtttgaaatcgagaatgccaacgtggaatgtctggcactcctcttg  
catgagtattatggagcatcgctggcctgggctacgtccattagcatctttgaaaacatg  
aacctgcgaacctctcgagagaaggcacgggatgacatgaaaagacattcaccagaagat  
cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtgccaggaatttcacaa  
gctgtgcaacaagatagtgccacagctgcagagacaaaagaacaagaaatttcacaagct  
atggaacaagaagggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggacatggagggtgacacatgg  
gactacaagagtcacgtgatgaccaaattcgtctgaggaggaggatgtacgtcgtagtttt  
gaaaacactgctgctgactggccggaatgcaaactggtggtgcttttgattcagac  
cgggtggggcttccggcctcgacgggtggttctgcacggaaagtcagggaattgggaaatcg  
gctctagccagaaggatcgctgctgtgctgggctgcaagggtggactctaccagggaatgttc  
tctactcgtcttcttcttccccgttagagagatgcagcgggaagaaggagagcagtgtcaca  
gagttcatcttccagggtggtgacactcccaggctcgggtgacggagatcatgtcccga  
ccagaaaggctgttgttcatcattgacgggttcgatgacctgggctctgtcctcaacaat  
gacacaaagctctgcaaagactgggctgagaagcagcctccgttcaccctcatacgcagt  
ctgctgaggaaggctcctgctcctgagtccttccctgatcgtcacctcagagacgtgggc  
acagagaagctcaagtcagaggtcgtgtctccccgttacctgttagttagaggaatctcc  
ggggaacaaagaatccacttgtctccttgagcgcgggattggtgagcatcagaagacacaa  
gggttgctgctgatcatgaacaacctgagctgctcgaccagtgccagggtgcccgcctg  
ggctctctcatctgctggccctgcagctgcaggacgtgggtgggggagagcgtcgcccc  
ttcaaccaaagcctcacaggcctgcacggccttttgtgtttcatcagctcaccctcga  
ggcgtggtccggcgtgtctcaatctggaggaaagagtgtcctgaagcgttctgcccgt  
atggctgtggaggaggtgtggaataggaaagtcagtggttgacgggtgacgacctcatgggt  
caaggactcggggagtctgagctccgtgctctgtttcacatgaacatccttctcccagac  
agccactgtgaggagtactacaccttcttccacctcagctctccaggacttctgtgccgcc  
ttgtactacgtgttagaggccctggaaatcgagccagctctctgcctctgtacgttgag  
aagacaaagaggtccatggagcttaaacaggcaggttccatatccactcgctttggatg  
aagcgtttctgtttggcctcgtgagcgaagacgtaaggaggccactggagggtcctgctg  
ggctgtcccgcttccctgggggtgaagcagaagcttctgcactgggtctctctgttgggt  
cagcagcctaattgccaccacccagagacacccctggagccttccactgtcttttcgag  
actcaagacaaagagtttgttcgcttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttccg  
attaaccagaacctggacttgatagcatcttcttctgctccagcactgtccgtatttg  
cggaaaaatcggggtggatgtcaaagggatcttcccaagagatgagtcgctgaggcatgt  
cctgtggtccctctatggatgccccgataagaccctcattgaggagcagtggggaagatttc  
tgctccatgcttggcaccacccacacctgcccgcagctggacctgggcagcagcatcctg  
acagagcggggcatgaagaccctgtgtgccaagtgtgagcattcccactgcaagatacag  
acctgatgttttagaaatgcacagattacccctgggtgtgagcacctctggagaatcgtc  
atggccaaccgtaacctaaagatccctcaacttgggaggcaccacctgaagggaaggat  
gtaaggatggcgtgtgaagccttaaaacacccaaaatgtttgttggagctcttgaggctg  
gattgctgtggattgacccatgcctgttacctgaagatctcccaaatccttacgacctcc  
ccagcctgaaatctctgagcctggcaggaaacaagggtgacagaccagggtgtaatgcct  
ctcagtgatgttttagaagtctccagtgccctgcagaagctgatactggaggactgt  
ggcatcacagccacgggttgccagagtctggcctcagccctcgtcagcaaccggagcttg  
acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaagggtgtaaatctactgtgtcga  
tccatgaggcttccctactgtagtctgcagaggctgatgtgaatcagtgccacctggac

Forts. Fig. 1

```

acggetggctgtgggttttcttgcaacttgccgttatgggtaactcatggctgacgcacctg
agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgcgaggtcatgaga
gaacctatcttgcctcctcaggacctggagttggtaaaagtgtcatctcaccgccgctgc
tgtgagagtgctgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg
gacaatgccctgggtgacgggtgggttgctgcactgtgcgagggactgaagcaaaagaac
agtgttctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgatgtgtgtgaggca
ctctccttggccctttcctgcaaccggcatctgaccagtctaaacctgggtgcagaataac
ttcagtgcccaaggaatgatgaagctgtgttcggcctttgacctgtccacgtctaactta
cagataattggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttcgagaatctgctctagtagtt
ttgcttaaagtcaactgtttccaagaacctatcaatgacattaaggaggagaacttactgtac
ctcccaaacctataacacgacctggcagagactctgaggaagggaattcatggatgg
actgaaaggctgtggaatggcagtagcctgtgcaaataaggaagctgctggaggaagtgc
cagctactcaagcccgagtcgtaattgacggtagttggcattcttttgatgaagatgac
cgattggatcttcaaagccagcaaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg
gcatcacagaagtcagatcccatcaacctgccacattccgtttggatagaagcactgct
gacggtgggacccgacctccacatcggggtcccgctgtgggctgtagggtgttcagt
gacgtccctgcttttacctgccaggtgaagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc
caaaagggtgcagacaaccacgtgtctatcagcagatga

```

1.13 >NALP9/Py13  
MAESFFSDFG LLWYLKELRK EEFWKFKELL KQPLEKFELK PIPWAEKKA SKEDVAKLLD  
KHYPGQAWB VTLNLFQIN RKDLWTKAQE EMRRSILASL FGGSSRGAQL LFCPRWKDLP  
LWAKVVIVFD PGETFRDAY GAVREEVDTH PAGHISRISP GATNGVTDIT ARLSSRPSSI  
LSA

```

>NALP9/Py13.cdna
atggcagaatcttttttttcggatttttggttgtgtgtatctgaaggagctcagaaaag
gaagagttttggaaatattaaggagctcctcaacaacctttggagaaatttgaactcaag
ccaatcccctgggctgagctgaagaaggcctccaagaagatgtagcaaaagctgctggac
aaacattaccagaaagcaggcatgggaggttaacactgaacctgtttctacagatcaat
aggaaagatctctggacaaaggctcaggaagagatgagaagaagcattcttgcgagcttg
tttgagggttctagtaggggagcacagcttctcttctgcccgcgatggaaggaccttct
ctatgggcaaaaggttgtcatcgtctttgacccaggggagactttcaggacggacgcata
ggagcagtgaggagggaagtggacacccacccagctggccacatcagccgaattagccct
ggggcgaccaatggggtgacagacatcacagcaggtgtcctcacgtcctggaagcatt
ctttctgcataa

```

1.14 >NALP10/Py14  
MAMAKARKPR EALLWALS DL EENDFKKLKF YLRDMTLSEG QPPLARGELE GLIPVDLAE L  
LISKYGEKEA VKVVLKGLKV MNLLELVDQL SHICLHGVGW HWKDNSRQKK VLDWATGTL Y  
PGRFDYVYFV SCKEVVLLE SKLEQLLFWC CGDNQAPVTE ILRQPERLLF ILDGFDLQR  
PFEEKLKKRG LSPKESLLHL LIRRHTLPTC SLLITTRPLA LRNLEPLLKQ ARHVHILGFS  
EEERARYFSS YFTDEKQADR AFDIVQKNDI LYKACQVPGI CWVVC SWLQG QMERGKV VLE  
TPRNSTDFM AYVSTFLPPD DDGGCSELSR HRVLRSLCSL AAEGLQHQR F LFEEAE LRKH  
NLDGPRLA AF LSSNDYQLGL AIKKFYSFRH ISFQDFHAM SYLVKEDQSR LGKESRRE VQ  
RLLEVKEQEG NDEMTLTMQF LLDISKKDSF SNLELKFCFR ISPCLAQDLK HFKEQMESMK  
HNRTWDLEFS LYEAKIKNLV KVFR

```

>NALP10/Py14
atggccatggccaaggccagaaagccccgggaggcattgctctgggccttgagtgacctt
gaggagaacgatttcaagaagttaaagtctacttacgggatatgacctgtctgagggc
cagccccactggccagaggggagttggagggcctgattccggtggacctggcagaatta
ctgatttcaagatatggagaaaagggtgtgaaagtgtcctcaagggttgaagggtc
atgaacctgttggaactgtggaccagctcagccatatttgtctgcatggggctggctgg
cactggaaagacaactctcgccagaaaaaggtgttggaactgggcccacgggtactctgtac
ccaggccgggttgattatgtcttttatgtaagctgcaaaagaagtggtcctgctgctggag
agcaaaactggagcagctccttttctggtgctgcggggacaatcaagccctgtcacagag
attctgaqcaqcaqcaqcaqctcctgttcatcctggatggctttgatgagctgcagagg

```

Forts. Fig. 1

ccctttgaagaaaagttgaagaagaggggtttgagtcccaaggagagcctgctgcacctt  
 ctaattaggagacatacactccccacgtgctcccttctcatcaccacccggcccttggt  
 ttgaggaatctggagcccttgctgaaacaagcacgtcatgtccatatcctaggcttctct  
 gaggaggagagggcgaggtacttcagctcctatttcacggatgagaagcaagctgaccgt  
 gccttcgacattgtacagaaaaatgacatttctctacaaagcgtgtcaggttccaggcatt  
 tgctgggtggtctgctcctggctgcaggggcagatggagagagggcaaagttgtcttagag  
 acacctagaaacagcactgacatcttcatggcttacgtctccaccttctgcccgcgat  
 gatgatgggggctgctccgagctttcccgccacagggctcctgaggagtctgtgctcccta  
 gcagctgaagggattcagcaccagaggttccctatttgaagaagctgagctcaggaaacat  
 aatttagatggccccaggttgcgcttctctgagtagtaacgactaccaattgggactt  
 gccatcaagaagtctacagcttccgccacatcagcttccaggacttttttcatgccatg  
 tcttacctggtgaaagaggaccaaagccggctggggaaggagtcccgcagagaagtgc  
 aggctgctggaggttaaaggagcaggaaggggaatgatgagatgacctcactatgcagttt  
 ttactggacatctcgaaaaaagacagcttctcgaacttggagctcaagttctgcttcaga  
 atttctccctgtttagcgcaggatctgaagcattttaagaacagatggaatctatgaag  
 cacaacaggacctgggatttgggaatttccctgtatgaagctaaaataaagaatctggt  
 aaagtattcagatga

1.15

&gt;NALP11/Py15

MAESDSTDFD LLWYLENLSD KEFQSFKKYL ARKILDFKLP QFPLIQMTKE ELANVLPISY  
 EGQYIWNMLF SIPSMRKED LCRKIIGRRN HVFYILQLAY DSTSYYSANN LNVFLMGERA  
 SGKTIIVINLA VLRWIKGEMW QNMISYVVLH TSHEINQMTN SSLAELIAKD WPDGQAPIAD  
 ILSDPKKLLF ILEDLDNIRF ELNVNESALC SNSTQKVPIP VLLVSLKLRK MAPGCWFLIS  
 SRPTRGNVVK TFLKEVDCCT TLQLSNGKRE IYFNSFFKDR QRASAALQLV HEDEILVGLC  
 RVAILCWITC TVLKRQMDKG RDFQLCCQTP TDLHAHFLAD ALTSEAGLTA NQYHLGLLKR  
 LCLLAAGGLF LSTLNFSGED LRCVGFTEAD VSVLQAANIL LPSNTHKDRY KFIHLNVQEF  
 CTAIAFLMAV PNYLIPSGSR EYKEKREQYS DFNQVFTFIF GLLNANRRKI LETSFGYQLP  
 MVDSEFKWYSV GYMKHLDRDP EKLTHHMLPF YCLYENREEE FVKTIVDALM EVTVYLQSDK  
 DMMVSLYCLD YCCHLRTLKL SVQRIQNKKE PLIRPTARLS YVSTASGFED LLKALARNRS  
 LTYLSINCTS ISLNMFSLLH DILHEPTCQI SHLX

&gt;NALP11/Py15.cdna

atggcagaatcggattctactgactttgacctgctgtggtatctagagaatctcagtgac  
 aaggaatttcagagttttaagaagtatctggcagcgaagattccttgatttcaaactgccca  
 cagtttccactgatacagatgacaaaagaagaactggctaactggttgccaatctcttat  
 gagggaacagtataatggaatatgctcttcagcatatttcaatgatgcgtaaggaagat  
 cttttaggaagatcattggcagacgaaaccatgtgttctacatacttcaattagcctat  
 gattctaccagctattattcagcaaaacaatctcaatgtgttccctgatgggagagagagca  
 tctggaaaaactattgtttataaatctggctgtgttgagggtggatcaagggtgagatgtgg  
 cagaacatgatctcgtagctcgttcacctcacttctcacgaaataaaccagatgaccaac  
 agcagcttgggtgagctaatcgccaaggactggcctgacggccaggctcccatgacagac  
 atcctgtctgatcccaagaaactccttttcatcctcgaggacttggacaacataagattc  
 gagttaaatgtcaatgaaagtgtttgtgtagtaacagcaccagaaagtcccatccca  
 gttctcctgggtcagtttgcaggaagagaaaatgggtccaggctgctggttccctcatctcc  
 tcaaggccacacgtgggaataatgtaaaaacgttcttgaaagaggttagattgctgcacg  
 accttgcagctgtcgaaatgggaagagggagatatattttaactcttctttaaagaccgc  
 cagagggcgctcggcagccctccagcttgatcatgaggatgaaataactcgtgggtctgtgc  
 cgagtgcacatcttatgctggatcacgtgtactgtcctgaagcggcagatggacaagggg  
 cgtgacttccagctctgctgccaacacccactgatctacatgccacttcttctgctgat  
 gcgttgacatcagaggctggacttactgccaatcagtatcacctagggtctcctaaaacgt  
 ctgtgttctgctggctgcaggaggactgttctgagcaccctgaatttcagtggtgaagac  
 ctcatgatgtgtgggttactgaggctgatgtctctgtgttgaggccgcgaatatctt  
 ttgcccagcaacactcataaagaccgttacaagttcatacacttgaaactccaggagttt  
 tgtacagccattgcatttctgatggcagtaaccaactatctgatcccctcaggcagcaga  
 gagtataaagagaagagagaacaataactctgactttaatcaagtgtttactttcatttt  
 ggtcttctaagtgcacacaggagaaagattcttgagacatccttggataccagctaccg  
 atggtagacagcttcaagtgttactcgggtgggatacatgaaacatttggaccgtgacccg  
 gaaaagttagcgcaccatattgccttctgttttactgtctctatgagaatcgggaagaagaa

Forts. Fig. 1

```
tttgtgaagacgattgtggatgctctcatggaggttacagtttaccttcaatcagacaag
gatatgatgggtctcattatactgtctggattactgctgtcacctgaggacacttaagttg
agtgttcagcgcacatctttcaaaacaaagagccacttataaggccaactgctaggttgcc
tatgtctcgactgcttctgtggttttgaagacttactcaaggctttggctcgtaatcggagc
ctgacatacctgagtatcaactgtacgtccatttccctaaatatgttttcacttctgcat
gacatcctgcacgagcccatgccaataagtcacatctgagm
```

1.16 >Py16 (mouse)  
MASFFSDFGLMWYLEELNKKEFMKFKEFLKQEILQLRLKQISWTEVKASREDLANLLLK  
HYEEKKAWDMTFKIFQKMNRLKOLMERAGREIAGLSNTGPPDRYEAPNTHTVDEFQVCVHS  
EMMHLTLKRLQAPGNLEARIPIVIEATVVFKKTGEPDAIALEVELQMGPDLSCLPNVSA  
YRVLIDIVLPEDPAIPLGLIYPEDVPTVRPGYPTAEQSDLKSHLMKIIEDFKBIINNS  
LKEIQENSGKQV

>Py16.dna  
atggcttcttttttttctgattttggccttatgtggtacttagaagagctaaacaagaaa  
gaattcatgaagtttaaggaatctctcaaacaggagattttgcagttgagactgaaacag  
atttcttgaccgaagtgaagaaggcatctcgtgaagacctgccaacttactgttgaaa  
cattatgaggagaagaaagcctgggatatgaccttcaaaatcttccagaagatgaatagg  
aaggatctcatggagagggcaggaagagagattgctggtctctcaaacactggaccacca  
gacagatatgaggcccccacacacatacagtagaggacttccaggtctgtgttcattca  
gagatgatgcacctaaccctcaagagactgcaggccccagggaatttagaggccaggatt  
ccaatggtcatagaagcaactgttgatttcaagaaaactggggagcctgatgctattgcc  
ttggaagtggaaactcagatgggacctgatttgtcatgcatattaccaatgtgtcggt  
taccgagttatggacatagtagtaccggaggatcccgaataacctctcctgggcatatat  
ccagaagatgttccaaccgttaagaccaggctaccctaaacagctgaagaacaagattct  
gacctaaaatcccatctcatgaagataatagaagactttaaggagattataaacaattca  
cttaagaaatacaggaaaactcaggcaaacaggataa

1.17 >NALP13/Py17  
MYEFYIHKGY DDVSSDNSRE KIKGEPSECE LGHFPRIPIWA NLRAADPLNL SFLLEHFFPK  
GQAWKVVLGI FQTMNLTSLC EKVRAEMKEN VQTQELQDPT QEDLEMLEAA AGNMOTQGCQ  
DPNQEELDEL EEETGNVQAQ GCQDPNQEEP EMLEADHRR KYRENKMAEL LETWDNISWP  
KDHVYIRNTS KDEHEELQRL LDPNRTRAQA QTIVLVGRAG VGKTLAMRA MLHWANGVLF  
QORFSYVYFL SCHKIRYMKE TTFARLISLD WPDFDAPIEE FMSQPEKLLF IIDGFEEIII  
SESRSESLDD GSPCTDWYQE LPVTILHSL LKKELVPLAT LLITIKTWV RDLKASLVNP  
CFVQITGFTG DDLRVYFMRH FDDSEVEKI LQQLRKNETL FHSCSAPMVC WTVCSCLKQP  
KVRYYDLQSI TQTTTSLYAY FFSNLFSTAE VOLADDSWPG QWRALCSLAI EGLWSMNFTF  
NKEDTEIEGL EVPFIDSLYE FNILQKINDC GGCTTFTHLS FQEFFAAMSF VLEEPREFPP  
HSTKPQEMKM LLQHVLLDKE AYWTPVVLFF FGLLNKNIR ELEDTLHCKI SPRVMEELLK  
WGEELX

>NALP13/Py17.cdna  
atgagtgacgtgaatccaccctctgacacccccattcccttttcatcctcctccactcac  
agttctcatattccgccttgacattctcttctgctaccccggtccccatgtgaaaatggg  
gtcatgtgtacatgagaaacgtgagccatgaggagctacaacggttcaagcagctctta  
ctgactgagctcagtagtggcaccatgcccatcacctgggaccagggtcgagacagccagc  
tgggcagaggtgggttcatctcttgatagagcggtttccctggacgacgcgcttgggatgtg  
acttcgaacatctttgccattatgaactgtgataaaatgtgtgtgtgtagtccgcagagag  
ataaatgccattctgcctaccttggaaaccagaggacttgaatgtgggagaaacacagggtg  
aatctggaggaaggagaatctggtaaaatacggcggtataaatcgaatgtgatggaaaaag  
tttttccccatattgggacattacgacttggcctggaaaccagagggacttcttctaccaa  
gggtgtacacagggcacgaggagtacttaccatgtctgcttctgccccaaaagacccagggt  
agacagcccaagaccgtggccatacaggagctcctgggatcggaacaaacacacacacacac  
aaaaagggtgatgtttgagtgggccagaaacaagttctacgccccacaagcgctgggtgtgct  
ttctacttccattgccaaagggtgaaccagacgacagaccagagcttctccgagctgatt  
gagcaaaagtggcctggatctcaggacctcgtgtcaaagattatgtccaaacccgaccaa  
cttctgctgctcttggatggctttaggagctcacatctaccctcattgacagactggag  
gacctgagtgaaactggaggcagaaattgcctgggtctgtcctactgagcagtttgcgtg



Forts. Fig. 1

agcaaaacgatgcttccagaggccacgctactgatcatgataagatttacctcttggcag  
acatgcaagcccttgctgaaatgtccctctctcgtaacccttccggggtttaatacgaag  
gaaaaaatcaagatattccagatgtattttggacacacagaggaggagaccaagtcttg  
agtttcgcccatggaaaacacccattctcttctccatgtgcccgggtccctgtgggtttgctgg  
atgggtctgctctgggtctgaaacagcaaatggagagaggaaaacatctcacacagtcagtg  
ccaaatgccacctctgtgttcgtccggtatatttctagcttggtttcccaccagagctgag  
aacttttccagaaagatccaccaagcacaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac  
agcatgtggcacaggaaatgggtgttaggtaaagaagatcttgaggaaagcgaagctggat  
cagacgggagtcacgcgcttcttggcatgagttattcttcggagaattgcaggtgaggaa  
gaccactatgtctttaccctcgtgacttttcaggaatttttgcggccttggtttatgtt  
ctctgtttcccaaaaagactcaaaaattttcatgtgttgagccacgtgaatatccagcgc  
ctgatagcgaagtcacagaggaaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttatcc  
gggttttctgaacgaggcctgcgcttcggccgtggaacagtcattccaatgcaaggtgtct  
ttcggtaataagaggaaactgtgaaagtcatacctctgttgcataaattgtgaccacct  
tctccgggagtggggtcccgagttattctactgtctgcatgaaatccgggaggaagcc  
tttgtaagccaagccctaaatgattatcataaagttgtcttgagaattggcaacaacaaa  
gaagttcaagtgctgcttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcatgaggtggaactg  
accgtcaccctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccatcctggctct  
gacctaaaggcgtgtgaatagcaccatgttgaaacaggacttaatcggtgttttgacgggg  
aaccagcatctgagatacttggaatacaacatgtggaagtggaagtcacaaagctgtgaag  
cttctatgcagggtgctgagatccccccgggtgccgtctgcagtgctcaggttggagac  
tgcttggccacccctagaatttggaactgatcttggaataatcttcaaggtaacgggcat  
ctaaagactctcactactaagaaaaactccctggagaactgtggggcgattacctgtct  
gtggcccgatggagaggctgtgcagagtaagatgtgacccacctgagcttggcagaa  
aacgccttgaaagatgaaggggccaagcatatttggaatgccctgccacacctgagatgt  
cctctgcagaggctgggtactgagaaagtgacttgacctttaattgctgtcaggatatg  
atctctgcgctctgtaaaaataaaacctgaaaagcttgacctaaagtttaatagcctg  
aaggatgatggggtgatcctgtgtgtgagggcctgaagaacctgactgtacattacag  
atcctggagactggaaaaactgcctgttcacctccatctgctgcaggccatggctccatg  
ctccggcaaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgcgattggagctat  
gggtattctgacctgtgtgcaggccttctcaagccaaaagaagagagaagaggtcattttc  
actattcacaatagccaagatttggaagcacctaagtgctccatcaacagatgaatggata  
aagaaaatgtggtacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag  
tgtagaaaacaatgggtatcatagaaaacagcacactgggtgctcaggtcctacttgctctata  
ttaccaagaatccacttttcccccaaaacctgagctctcagccttgatcaagatggaa  
ggagacaaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgtctctatgagctagac  
aaggaagaatttcagacattcaaggaaattactaaagaagaatcttcagaatcgaccaca  
tgctctattccacagtttgaaatcgagaatgccacgtggaatgtctggcactcctcttg  
catgagtattatggagcatcgctggcctgggctacgtccattagcatctttgaaaacatg  
aacctgcgaacctctcggagaaggcacgggatgacatgaaaagacattcaccagaagat  
cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtgccaggaatttcacaa  
gctgtgcaacaagatagtgccaagctgcagagacaaaagaacaagaaatttcacaagct  
atggaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaaatttcacaagctatg  
gaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggaatggaggtgacacatgg  
gactacaagagtcacgtgatgaccaaattcgctgaggaggaggatgtacgtcgtagtttt  
gaaaacactgctgctgactggccggaatgcaaacgttggtctggtgcttttgattcagac  
cgggtggggcttccggcctcgacgggtggttctgcacggaaagttaggaattgggaaatcg  
gctctagccagaaggatcgctgtgtgtggcgcaaggtggactctaccagggaatgttc  
tctacgtcttcttccctccggttagagagatgcagcggaagaaggagagcagtgctcaca  
gagttcatctccaggagtgccagactcccaggctccgggtgacggagatcatgtcccga  
ccagaaaggctgtgtgtcatcatgacgggttcgatgacctgggctctgtcctcaacaat  
gacacaaagctctgcaaagactgggctgagaagcagcctccgttcaccctcatacgcagt  
ctgctgaggaaggtcctgtccttgagtccttctctgatcgctcaccgtcagagacgtgggc  
acagagaagctcaagtcagaggtcggtgtctcccggtacctgttagttagaggaatctcc  
ggggaacaaagaatccacttgctccttgagcgcggtattgggtgagcatcagaagacacaa  
gggttgctgtgcgatcatgaacaacctgagctgctcgaccagtgccaggtgcccgcgctg  
ggctctctcatctcggtggccctgcagctgcaggacgtgggtgggggagagcgtcgcccc  
ttcaaccaaacgctcacaggcctgcacgcccgttttgtgtttcatcagctcaccctcga



Forts. Fig. 1

ggcgtgggtccggcgctgtctcaatctggaggaaagagttgtcctgaagcgcttctgccgt  
 atggctgtggagggagtggtgaataggaagtcagtggttgacgggtgacgacctcatgggt  
 caaggactcggggagctctgagctccgtgctctgtttcacatgaacatccttctcccagac  
 agccactgtgaggagtactacaccttcttccacctcagctctccaggacttctgtgccgcc  
 ttgtactacgtgttagagggcctggaaatcgagccagctctctgccctctgtacgttgag  
 aagacaaagaggtccatggagcttaaacaggcaggcttccatattccactcgctttggatg  
 aagcgtttctgtttggcctcgtgagcgaagacgtaaggaggccactggaggtcctgctg  
 ggctgtcccgttccccgggggtgaagcagaagcttctgcaactgggtctctctgttgggt  
 cagcagcctaatagccaccacccaggagacacctggagccttccactgtcttttcgag  
 actcaagacaaagagtttgttcgcttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttccg  
 attaacacagaacctggacttgatagcatcttcttctgacctcagcactgtccgtatttg  
 cggaaaattcgggtggatgtcaaagggatcttcccaagagatgagtcgctgaggtcatgt  
 cctgtgggtccctctatggatgaggataaagacctcattgaggagcagtgaggaaagtctt  
 tgctccatgcttggcaccacccacacctgaggcagctggacctgggcagcagcatcctg  
 acagagcgggcatgaagacctgtgtgccaagctgaggcatcccacctgcaagatacag  
 acctgatgtttagaaatgcacagattaccttgggtgtgagcacctctggagaatcgct  
 atggccaacctgaacctaaagatccctcaacttgggaggcaccacctgaaggaagaggat  
 gtaaggatggcgtgtgaagccttaaaacacccaaaatgtttgttggagtctttgaggctg  
 gattgtgctggtattgacctatgacctgttacctgaagatctccaaatccttacgacctcc  
 ccagcctgaaatctctgagcctggcaggaaacaaggtgacagaccagggagtaatgcct  
 ctacgtgatgccttgagagctctccagctgcccctgcagaagctgatactggaggactgt  
 ggcatcacagccacgggttgccagagctgtggcctcagccctcgtcagcaaccggagcttg  
 acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaaggtgtaaatctactgtgtcga  
 tccatgaggcttccccactgtagtctgcagaggctgatgtgaatcagtgccacctggac  
 acggctggctgtggttttcttgcaactgctgcttatgggtaactcatggctgacgcacctg  
 agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgagaggctcatgaga  
 gaacctcttgtcatctccaggacctggagtggtaaggtgtcatctcaccgccgcgtgc  
 tgtgagagctctgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcag  
 gacaatgccctgggtgacggtggggttctgtgcaactgtgagaggactgaagcaaaagaac  
 agtgttctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgattgtgtgtgaggca  
 ctctccttggcccttctctgcaaccggcatctgaccagcttaaacctgggtgcagaataac  
 ttcagctcccaaaggaatgatgaagctgtgttcggccttgcctgtcccacgtctaactta  
 catgaatgggcaatgactctgaagaaaatgacgttctctcgagaatctgctctagtagtt  
 ttgcttaaagtcactgtttccaagaacctatcaatgacattaagggagaacttactgtac  
 ctccccaaacctataacacgacccggcacagagactctgaggaaggaattcatggatgg  
 actgaaaggctgtggaaatggcagtagacctgtgcaaaataaggaagctgctggaggaagt  
 cagtagctcaagcccgagtcgtaattgacggtagttggcattcttttgatgaagatgac  
 cgattggatcttcaaagccagcaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg  
 gcatcacagaagtcatatccatcaacctgccacattccgtttggatagaagcactgct  
 gacggtgggaccggccacttccacatcggggtcccgcctgtgggtgttaggggtgttcagt  
 gacgtccctgcttttacctgccaggtgaagagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc  
 caaagggtgcagacaacccacgtgtctatcagcagatga

1.18

>NALP14/Py18 (mouse)  
 MGASLWYGPQ VVPVTGDQKF CLTLTPAHLA DFGFIWYWE LNKEIFMYFK ELLIHEILQM  
 GLKQISWTEV KEASREDLAI LLVKHCDGNQ AWDTTFRVFQ MIGRNVITNR ATGEIAAHST  
 IYRAHLKEKL THDCSRKFNI SIQNFQDEY DHLENLLVPN GTENNPKMVV LQGVAGIGKT  
 ILLKNLMIVW SEGLVFQNKF SYIFYFCCHD VKQLQTASLA DLISREWSPS SAPMEEILSQ  
 PEKLLFIIDS LEGMEWNVITQ QDSQLCYNCM EKQPVNVLLS SLLRKKILPE SLLISTSCE  
 TFKDLKDIE YTNVRTITGF KENNINMCFH SLFQDRNIAQ EAFSLIRENE QLFTVCQAPV  
 VCYMVATCLK NEIESGKDPV SICRRRTSLY TTHILNLFIP HNAQNPSNNS EDLLDNLCFL  
 AVEGMWTDIS VFNEEALRRN GIMDSIPTL LDIGILEQSR ESENSYIFLH PSVQEFCAAM  
 FYLLHSEMDH SCQGVYFIET FLFTFLNLIK KQWVFLGCFE FGLLHETEQE KLEAFFGYHL  
 SKELRRQLFL WLELLLDLTL PDVKKINTMK FFYCLFEMEE EVFVQSAMNC REQIDVVVKG  
 YSDFIVAAYC LSHGSALTDF SISAQMC  
 >NALP14/P18.cdna (mouse)  
 atgggtgcctccttatggtatgggcctcaagttgtaccagtcactgggtgatcaaaagttc  
 tgctcacccttaccacagcagcatcttgagattttggctttatatgttactggaaagag

Forts. Fig. 1

ctaaacaagatagaattcatgtattttaaggaattactcatacatgaaattctgcaaagt  
 ggtctaaaacagatttcttgactgaagtaaaggaagcatctcggaagaccttgccatc  
 ttactggtaaaacattgtgacgggaatcaagcctgggatacgaccttcagagtcttccag  
 atgattgggaggaatgttatcactaatagggcaacaggagagattgctgcacactcaaca  
 atatatcgagctcatttaaaggagaagctgacccatgattgttctagaaagttcaacatc  
 agtattcagaatttcttccaggatgaatatgatcatcttgagaaccttctgtaccaaat  
 ggaactgaaaacaatccaaagatgggtgtcctgcaagggtgtagctggaattggcaagact  
 attctgttaaaaaatttaattgattgtctggtcagaaggcctggatttccagaacaaattc  
 tcttatatcttctacttctgctgtcatgatgtgaagcaattgcagacagcaagcctggct  
 gatctgatctccagagagtgccctagccctcagctcccatggaggagatcctatcccaa  
 cctgagaaactcttattcatcattgacagcttagaagggtggaatggaatgttacccaa  
 caggattcgcagctgtgttacaattgcatggagaagcagccagtaaatgtattgctgagc  
 agtttgctcaggaagaagatactccctgaatcatctctcctcatctccactagtgtgtgag  
 acttttaaggatttgaaggactggattgagtagacacaaatgtgagaacaataaccggattc  
 aaggaaaacaatattaatatgtgtttccacagcttgttccaagataggaacattgcccag  
 gaggccttcagtttgataagagaaaatgagcagctgttccactgtatgtcaggccccctgtg  
 gtctgtacatgggtggctacttgtcttaaaaatgagatagagagtggaagacccagtc  
 tccatctgccagctaccacctccctgtataccactcacatcttaaatttgttcatctcc  
 cacaatgccccaaaatccaagtaacaatagcgaagacctgctggataactgtgttttcta  
 gctgtagagggtcatgtggactgatatactgtgtttaaaggaggctctaaggagaaat  
 gggatcatggattctgacatccccacactgctggatattggaattcttgagcagagcagg  
 gaatctgaaaattcttacatatctctccacccctgctgcccaggagttctgtgcccgcctg  
 ttttatctgctacatagtgaatggatcactcttgcagggtgtttactttatagaaca  
 ttctgtttacttttctaaacaagatcaaaaaacagtggtttttttgggctgtttcttc  
 tttggtcttttacatgaaacagaacaagaaaagctggaggcattttttggctaccactta  
 tctaaagaattaaaggcgacagtgtttttgtggtggaactcctattggacactttacat  
 cctgacgtaaaaaaaataaataccatgaagttcttttactgtctgtttgagatggaagag  
 gaagtcctttgtacagtcagcaatgaactgtagggaacagattgacgttgtggttaagggt  
 tattctgattttattgttgcctactgcttaagccatggctctgactgacagacttc  
 tccatttcagctcaaatgtgctga

1.19

&gt;NALP15/Py19.hs

LEELKKEEFKFKFKEHLKQMTLQLELKQIPWTEVKKSIREELANLLIKHYEEQQAWNITLRFQKM  
 DRKDLCKMVMRERTGYT....  
 XYTKTYQAHAKQKFSRLWSSKSVTEIHLVYFEEVKQEECDHLDRFLFAPKEAGKQPRTVII  
 QGPQGIGKITTLLMKLMMAWS DNKIFRDRFLYTFYFCCRELRELPPPTSLADLISREWPDPFA  
 APITEIVSQPERLLEVIDSFEELOQGLNEPDSDLGDLMEKRPVQVLLSSLLRKKMLPEA  
 SLLIAIKPVC PKELRDQVTISEIYQPRGFN ESDRLVYFCCFFKDPKRAMAFNVLVRESEQ  
 LFSICQIPLLCWILCTSLKQEMQKGKDLALTCQSTTSVYS SFVFNLFTEP GAEGPTPQTQ  
 HOLKALCSLA AEGMWIDTFEFCEDDLRRNGVVDADIPALLGTKILLKYGERESSVYFLHV  
 CIOEFCAALFYLLKSHLDHPHPAVRCVQELLVANFEKARRAHWIFLGCFLTGLLNKKEQE  
 KLDAFFGFQLSQEIQQIHOCLKSLGERGNPQGQVDSLAI FYCLFEMQDP AFVKQAVNLL  
 QEANFHIIDNVDLVVSAYCLKYCSSLRKLCFSVQNVFKKEDEHSSTSDYSLICWHHICSV  
 LTTSGHLRELQVQDSTLSESTFVTWCNQLRHPSCRLQKLG INNVSFSGQS VLLFEVLPHYQ  
 PDLKYLSTLTKLSRDDIRSLCDALNYPAGNVKELALVNC HLSPIDCEVLAGLLTNKKL  
 TYLNVSCNQLDTGVPLLCEALCSPDVTLVYLMALFCHLSEQCCEYISEMLLRNKSRYLD  
 LSANVLKDEGLKTLCEALKHPDCCLDSLCLVKCFITAAGCEDLASALISNQNLIKILQIGC  
 NEIGDVGVLQLCRALTHTDCLREILGLEECGLTSTCCKDLASVLTCSKITLQQLNLTNLTL  
 DHTGVVVLCEALRHPECALQVLGLRKTFDEETQALLTAE EERNPNLTITDDCDTITRVE  
 I

&gt;NALP15.hs.dna (partial)

gccccgcga aacctcacgc ccccccaac tacggcagta cgagccggtt aaatcggacg  
 agattatcat gttctggtca cgtctcttga ggattgggtat ctctgctcca gaaaagatgg  
 cagcctcttt ctgctctgat ttggtcttat gtggtatctg gaggagctca aaaaggagga  
 gttcaggaaa tttaaagaac atctcaagca aatgacttgc agctgaactc aagcagatc  
 cctggactga ggtcaaaaaa agcatccccg gaagaacttg caaacctctt gatcaagcac

Forts. Fig. 1

1.20

```
tatgaagaac aacaagcttg gaacataacc ttaagaatct ttcaaaagat ggatagaaag
gatctctgca tgaaggatcat gagggagaga acaggatata caaagaccta tcaagctcac
gcaaagcaga aattcagccg cttatgggtcc agcaagtctg tcaactgagat tcacctatac
tgtgaggagg aagtcaagca agaagaatgt gaccatttgg accgcctttt tgctcccaag
gaaactggga aacagccacg tacagtgtatt attcaaggac cacaaggaac tcggaaaaaa
cgacactcct gatgaagctg atgatggcct ggtcggacaa caagatcctt cgggatagggt
tcgtgtacac gtgctatttc tgctgcagag aactgagg
```

&gt;NALP12/Py20.mm\*

```
MTSVRCKLAQ YLEDLEDVDL KKFKMHLEDY PPEKGCIPVP RGQMEKADHL DLATLMIDFN
GEEKAWAMAV WIFAAINRRD LWKAKKDQP EWNCTCTSHS SMVCQEDSLE EEWMGLLGYL
SRISICKKKK DYCKMYRRHV RSRFYSIKDR NARLGESVDL NSRYTQLQLV KEHPSKQERE
HELLTIGRTK MRDSPMSSLK LELLFEPEDG HSEPVTVVVF QGAAGIGKTI LARKIMLDWA
LGKLFKDKFD YLFFIHCREV SLRTPRSLAD LIVSCWDPFN PPVCKILRKP SRILFLMDGF
DELQGFDEH IGEVCTDWQK AVRGDILLSS LIRKKLLPKA SLLITTRPVA LEKLQHLLDH
PRHVEILGFS EAKRKEYFFK YFSNELQARE AFRLIQENEV LFTMCFIPLV CWIVCTGLKQ
QMETGKSLAQ TSKTTTAVYV FFLSSLLQSR GGIEEHLFSD YLQGLCSLAA DGIWNQKILF
EECDLRKHGL QKTDVSAFLR MNVFOKEVDC ERFYSFST
```

&gt;NALP12/Py20.cdna

```
atgacgagtggtccggttgcaagctgggtcagtatctagaggaccttgaagatgtggacctc
aagaaattcaaaatgcatttgggaagattaccgccccgagaagggtgtatcccagtcctcc
agggccagatggagaaggcagatcacttggatctagccacactcatgattgacttcaat
ggcgaggagaaggcctgggccatgggtgtgtggatccttctgctgcgatcaacaggcgagac
ctctgggaaaaagctaagaaggaccagccagagtggatgacacgtgtacatcacattcc
tctatggtatgccaggaggacagccttgaagaagagtggatgggtttgctgggatatctc
tcccgcatctccatttgtaaaaagaagaagattactgtaagatgtacagacgacatgtg
agaagcaggttctactctatcaaggacaggaacgcgcgtctagggtgagagtgtggacctc
aacagtcgctacacgcagctccaactgggtcaaggagcatccaagcaagcaggagcgggag
catgaactcctgaccatcggccggactaaaatgcgggacagcccatgagttcccttaag
ctggagctgctgtttgagccccgaggacgggcactcggagcctgtgcacacagtggtgttc
caggagcagcaggcatcgggaaaaccatcctagccagggaagattatgttggactgggca
ctgggaaaagctcttcaaagacaaatttgactatttgttcttccactgcccagagaggtg
agcctcaggacgccaaggagtctagcagacctgattgtcagctgctggcctgacccaaac
ccaccagtgtgcaagatcctgcgcaagccttccaggatcctcttccatcatggatggcttt
gatgagctacaaggggcttggacgagcacattggggagggtctgcacagactggcaaaag
gctgtgcggggagacattctgctaagcagcctcatccgaaagaaactgctgcccaggcc
tctctgctcataacgacgagggcgggtagccttggagaaaactgcagcatctcctggaccac
ccccgcatgtggagatcctagggttctctgaggccaaaaggaggagtatttctttaag
tatttctccaacgagctgcaggccccgggaggccttcaggctgatccaagagaatgaggtc
ctctttaccatgtgcttcatccccctgggtctgctggattgtgtgcacggggctaaagcaa
cagatggagaccgggaagagcctggcccagacctccaagaccactacggccgtctacgtc
ttcttcttccagcctgctgcaatccccggggggcattgaggagcatctcttctctgac
tacctacaggggctctgttcaactggctgcggatggaatttggaaaccagaaaatcctattt
gaggagtgtgatctgcgggaagcagggcctgcagaagactgacgtctccgcttctcctgagg
atgaacgtgttccagaaggaagtggactgcgagagattctacagcttcagcacatga
```

Fig. 2

## The PYD family summary

## A) Human proteins cloned and sequenced in our laboratory (NALP6 only partially)

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
Pyrin ✓		No EST	From N. Tidow	16p13.3	PYD; B-Box; SPRY
Pycard ✓		>40	From ESTs	16	PYD; CARD
Pyc ✓		>3	From EST	16	PYD
NALP1 ✓		>20	From Kiaa		PYD; NACHT; LRR; X; CARD
NALP2 ✓	Py7	>30	From NEDO	19	PYD; NACHT; LRR
NALP6 ✓	Py9	>10	From EST (partial)	11	PYD; NACHT; LRR

## B) Human proteins partial sequences from genomic databases matching public ESTs

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
NALP3 ✓	Py5	>3		19	PYD; NACHT; LRR
NALP7 ✓	Py11	3		19	PYD; NACHT; LRR
NALP10 ✓	Py14	1		2	PYD; NACHT; LRR
NALP11 ✓	Py15	3		19	PYD; NACHT; LRR
NALP15 ✓	Py19	>3		19	PYD; NACHT; LRR

## Forts. Fig. 2

## C) Human proteins partial sequences from genomic databases matching no public human ESTs

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
NALP4 ✓	Py6	1 pot from mouse		11	PYD; NACHT; LRR
NALP5 ✓	Py8			19	PYD; NACHT; LRR
NALP8 ✓	Py12			19	PYD; NACHT; LRR
NALP9 ✓	Py13			19	PYD; NACHT; LRR
NALP13 ✓	Py17			19	PYD; NACHT; LRR
Py10 ✓				11 or 3	PYD

## D) Mouse "new" proteins partial sequences from genomic databases matching no public ESTs apparently (1 est for NALP14 and 1 EST in a human sequence for NALP12 but no PYD for the moment in this partial human sequence)

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
Py16 ✓					PYD .... interesting to follow
NALP12 ✓	Py20	-			PYD; NACHT; LRR
NALP14 ✓	Py18	1			PYD; NACHT; LRR

```

ID    PYD_DOMAIN; MATRIX.
AC    ZZ99999;
DT    Mon Oct 30 13:50:41 2000
DE    Generated from MSF file: 'stdin'.
MA    /GENERAL_SPEC: ALPHABET='ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ';
LENGTH=82;
MA    /DISJOINT: DEFINITION=PROTECT; N1=6; N2=77;
CC    Automatic scaling using medium database
MA    /NORMALIZATION: MODE=1; FUNCTION=LINEAR; R1=1.0442;
R2=0.01858709; TEXT='NScore';
MA    /CUT_OFF: LEVEL=0; SCORE=401; N_SCORE=8.5; MODE=1;
MA    /CUT_OFF: LEVEL=-1; SCORE=293; N_SCORE=6.5; MODE=1;
MA    /DEFAULT: M0=-8; D=-20; I=-20; B1=-60; E1=-60; MI=-105;
MD=-105; IM=-105; DM=-105;
MA    /I: B1=0; BI=-105; BD=-105;
MA    /M: SY='L'; M=-11,-28,-22,-29,-20,12,-29,-16,15,-
26,38,18,-28,-29,-17,-18,-28,-11,5,-9,7,-18;
MA    /M: SY='E'; M=-10,11,-28,19,39,-27,-17,-1,-29,10,-22,-
19,2,-5,13,4,2,-7,-26,-28,-15,26;
MA    /M: SY='E'; M=-12,22,-26,22,26,-24,-13,3,-26,3,-23,-
18,20,-11,13,-1,2,-7,-28,-31,-16,20;
MA    /M: SY='L'; M=-9,-30,-20,-31,-22,8,-31,-22,24,-
29,42,19,-29,-29,-21,-21,-27,-9,17,-21,-1,-22;
MA    /M: SY='S'; M=-2,5,-19,3,2,-21,-2,-8,-20,-4,-22,-16,10,-
11,-2,-5,14,6,-15,-33,-18,0;
MA    /M: SY='E'; M=0,2,-27,5,11,-30,-12,-2,-25,10,-24,-
13,0,1,10,1,0,-7,-21,-26,-15,9;
MA    /M: SY='D'; M=-14,17,-29,26,26,-25,-18,-1,-24,5,-20,-
18,5,-10,6,-3,-3,-9,-21,-28,-10,15;
MA    /M: SY='E'; M=-11,18,-28,24,45,-30,-16,2,-29,7,-23,-
20,11,-5,17,-1,2,-8,-30,-32,-20,31;
MA    /M: SY='L'; M=-12,-28,-19,-31,-22,30,-28,-19,11,-
29,33,11,-24,-29,-25,-19,-23,-8,6,-12,8,-22;
MA    /M: SY='K'; M=-11,1,-28,1,10,-26,-17,-3,-24,20,-22,-
7,1,-13,15,19,-3,-8,-20,-18,-10,12;
MA    /M: SY='K'; M=-10,-2,-26,-1,10,-23,-18,-6,-26,28,-24,-
12,0,-12,8,26,-2,-2,-18,-22,-8,7;
MA    /M: SY='F'; M=-19,-28,-21,-37,-27,70,-29,-19,-1,-
25,9,0,-19,-29,-36,-17,-20,-10,-1,7,26,-27;
MA    /M: SY='K'; M=-10,-2,-30,-3,8,-29,-21,-9,-25,41,-26,-7,-
1,-11,13,26,-10,-10,-18,-20,-9,10;
MA    /M: SY='F'; M=-9,-12,-23,-13,-1,2,-21,-5,-7,-7,-2,0,-9,-
17,-4,-7,-6,-5,-8,-18,1,-2;
MA    /M: SY='Y'; M=-12,-18,-25,-19,-11,6,-21,-10,-6,0,7,2,-
16,-23,-11,0,-19,-11,-6,-9,10,-11;
MA    /M: SY='L'; M=-10,-28,-21,-28,-16,7,-30,-20,20,-
28,43,18,-27,-27,-18,-20,-27,-10,10,-21,-1,-17;
MA    /M: SY='R'; M=-3,-13,-26,-14,-8,-17,-5,-12,-16,-1,-10,-
7,-9,-12,-4,1,-7,-7,-13,-15,-12,-7;

```

Fig. 3/1

```

MA  /M: SY='B'; M=-6,15,-20,14,5,-23,-13,-3,-23,0,-21,-
16,11,-12,2,-1,10,12,-17,-32,-14,3;
MA  /M: SY='E'; M=-4,-9,-22,-10,5,-10,-21,-13,-10,3,-10,-5,-
9,-10,-4,1,-4,-1,-5,-22,-10,0;
MA  /I: I=-4; MD=-18;
MA  /M: SY='P'; M=0,-9,-18,-10,-5,-14,-9,-13,-6,-6,-11,-7,-
5,5,-4,-7,3,1,-6,-21,-12,-6; D=-4;
MA  /I: I=-4; MD=-18;
MA  /M: SY='L'; M=-8,-18,-10,-19,-11,-3,-24,-9,6,-18,19,10,-
18,-23,-8,-13,-15,-5,3,-23,-4,-10; D=-4;
MA  /I: I=-4; MD=-18;
MA  /M: SY='E'; M=-5,4,-23,8,23,-26,-10,-3,-25,7,-21,-15,2,-
7,13,8,4,-5,-21,-26,-16,17; D=-4;
MA  /I: I=-4; MD=-18;
MA  /M: SY='E'; M=-10,-6,-22,-4,6,-7,-18,-4,-13,0,-6,-4,-6,-
5,-2,-1,-7,-5,-12,-20,-6,2; D=-4;
MA  /I: I=-4; MD=-18;
MA  /M: SY='G'; M=-3,-2,-23,1,3,-23,21,-11,-27,-4,-21,-
15,0,-12,-5,-7,1,-8,-19,-22,-20,-1; D=-4;
MA  /I: I=-4; MD=-18;
MA  /M: SY='H'; M=-9,-10,-19,-11,-6,-1,-15,11,-6,-12,3,1,-
8,-17,-4,-8,-8,-3,-8,-14,8,-6; D=-4;
MA  /I: I=-4; MI=0; MD=-18; IM=0; DM=-18;
MA  /M: SY='P'; M=-6,-10,-21,-9,-4,-20,2,-11,-22,-3,-22,-
10,-5,4,0,-5,-1,-8,-20,-23,-17,-3; D=-4;
MA  /I: I=-4; DM=-18;
MA  /M: SY='R'; M=-10,-5,-26,-6,1,-22,-12,-6,-23,14,-21,-
11,0,-2,6,23,-3,-4,-19,-23,-14,1; D=-4;
MA  /I: I=-4; DM=-18;
MA  /M: SY='I'; M=-8,-26,-25,-32,-23,-1,-35,-27,36,-
25,17,14,-20,-21,-19,-25,-16,-4,25,-23,-3,-24;
MA  /M: SY='P'; M=-2,-14,-30,-10,-2,-25,-17,-18,-18,-8,-25,-
17,-13,54,-8,-14,0,2,-21,-29,-25,-9;
MA  /M: SY='W'; M=-16,-19,-37,-19,-8,-12,-20,-9,-22,3,-19,-
12,-16,-16,3,11,-19,-15,-24,42,5,-2;
MA  /M: SY='G'; M=5,-4,-20,-7,-11,-14,17,-16,-24,-12,-21,-
16,2,-16,-13,-14,9,1,-15,-24,-17,-11;
MA  /M: SY='E'; M=1,2,-24,3,22,-26,-15,-3,-22,5,-18,-13,0,-
2,13,0,3,-4,-21,-27,-17,17;
MA  /M: SY='L'; M=-7,-29,-19,-31,-24,3,-30,-23,26,-
25,27,17,-27,-22,-21,-21,-21,-7,24,-24,-5,-24;
MA  /M: SY='E'; M=-12,3,-29,8,24,-24,-18,0,-21,8,-13,-10,-
2,-10,10,4,-7,-11,-20,-26,-12,16;
MA  /M: SY='K'; M=-5,0,-25,-2,9,-26,-14,-6,-23,20,-21,-7,1,-
11,13,14,-1,-2,-18,-23,-12,11;
MA  /M: SY='A'; M=28,-14,-13,-23,-13,-11,-9,-17,0,-13,5,6,-
14,-15,-10,-18,-1,-1,3,-20,-13,-12;
MA  /I: I=-6; MI=0; MD=-32; IM=0; DM=-32;
MA  /M: SY='D'; M=-10,23,-23,27,5,-27,-6,-4,-26,-1,-26,-
21,18,-13,-1,-1,9,0,-21,-36,-18,1;

```

Fig. 3/2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

MA /M: SY='P'; M=-4,-13,-31,-11,-2,-23,-3,-15,-22,0,-22,-  
 14,-10,12,-6,0,-7,-12,-20,-15,-18,-6;  
 MA /M: SY='I'; M=-5,-15,-24,-16,-1,-11,-27,-17,9,-6,5,5,-  
 15,-16,-7,-11,-12,-8,8,-24,-9,-5;  
 MA /M: SY='D'; M=-14,26,-24,35,24,-35,-15,0,-32,8,-26,-  
 20,12,-10,12,-1,-1,-9,-28,-33,-18,18;  
 MA /M: SY='L'; M=-8,-29,-18,-30,-22,7,-29,-20,22,-  
 27,40,21,-29,-29,-20,-19,-26,-8,17,-22,-2,-21;  
 MA /M: SY='A'; M=31,-12,-10,-19,-13,-15,-9,-21,-3,-12,-7,-  
 7,-11,-14,-13,-18,10,9,9,-25,-17,-13;  
 MA /M: SY='D'; M=-11,14,-25,16,14,-19,-16,1,-21,-1,-18,-  
 15,10,-12,3,-4,2,-2,-20,-30,-12,8;  
 MA /M: SY='L'; M=-10,-24,-23,-26,-16,2,-30,-17,15,-  
 16,28,14,-23,-25,-13,-13,-23,-9,8,-18,2,-15;  
 MA /M: SY='L'; M=-10,-29,-20,-30,-20,12,-29,-17,19,-  
 27,44,24,-28,-29,-18,-19,-28,-10,10,-19,1,-19;  
 MA /M: SY='V'; M=-4,-16,-20,-17,-18,-8,-27,-19,15,-16,3,4,-  
 17,-16,-18,-18,-9,-1,20,-28,-9,-19;  
 MA /M: SY='S'; M=1,2,-20,-1,7,-22,-10,-9,-17,2,-20,-12,5,-  
 10,6,-3,10,7,-14,-29,-15,6;  
 MA /M: SY='H'; M=-13,-6,-24,-9,-7,-1,-21,29,-15,-6,-13,-  
 4,0,-21,0,-1,-4,-4,-15,-14,20,-6;  
 MA /M: SY='Y'; M=-13,-20,-12,-24,-21,31,-26,2,-5,-16,-2,-  
 4,-17,-28,-18,-15,-12,-7,-7,10,45,-21;  
 MA /M: SY='G'; M=-6,-7,-21,-4,-5,-22,11,-15,-24,-14,-18,-  
 15,-6,1,-12,-16,-3,-7,-21,-26,-20,-9;  
 MA /M: SY='E'; M=1,-1,-25,3,18,-27,5,-10,-28,-1,-24,-19,-  
 1,0,2,-8,7,-6,-23,-28,-22,9;  
 MA /I: I=-6; MD=-32;  
 MA /M: SY='E'; M=-8,2,-25,2,10,-21,-7,-3,-21,7,-20,-12,3,-  
 13,7,4,0,-6,-19,-21,-7,8; D=-6;  
 MA /I: I=-6; MI=-32; IM=-32; DM=-32;  
 MA /M: SY='Y'; M=-15,-8,-32,-5,0,-8,-21,0,-17,1,-14,-10,-  
 10,-15,5,2,-12,-11,-20,12,17,1;  
 MA /M: SY='A'; M=37,-13,-14,-21,-14,-18,2,-21,-5,-13,-8,-  
 7,-11,-13,-13,-21,5,-3,2,-20,-19,-14;  
 MA /M: SY='W'; M=-8,-30,-31,-30,-22,1,-18,-25,-4,-17,-4,-  
 7,-29,-27,-19,-15,-23,-16,-2,51,7,-19;  
 MA /M: SY='E'; M=-8,10,-24,12,14,-24,-13,-2,-21,7,-19,-  
 8,7,-11,8,4,2,-5,-19,-30,-15,11;  
 MA /M: SY='V'; M=2,-23,-15,-26,-20,-2,-24,-21,15,-  
 16,17,12,-23,-24,-18,-16,-12,0,20,-24,-7,-19;  
 MA /M: SY='T'; M=10,-7,-11,-14,-12,-11,-16,-20,-4,-12,-6,-  
 7,-6,-14,-12,-14,14,28,6,-29,-12,-12;  
 MA /M: SY='L'; M=-7,-26,-19,-30,-22,11,-28,-20,18,-  
 23,23,15,-23,-26,-20,-16,-18,-7,15,-19,0,-21;  
 MA /M: SY='N'; M=-6,7,-24,4,6,-26,-8,2,-24,8,-24,-13,12,-  
 13,11,8,6,-1,-22,-28,-14,8;  
 MA /M: SY='I'; M=-5,-25,-21,-31,-27,-2,-29,-28,31,-  
 24,12,11,-20,-22,-22,-24,-11,0,29,-24,-6,-27;

Fig. 3/3

ERSATZBLATT (REGEL 26)



```

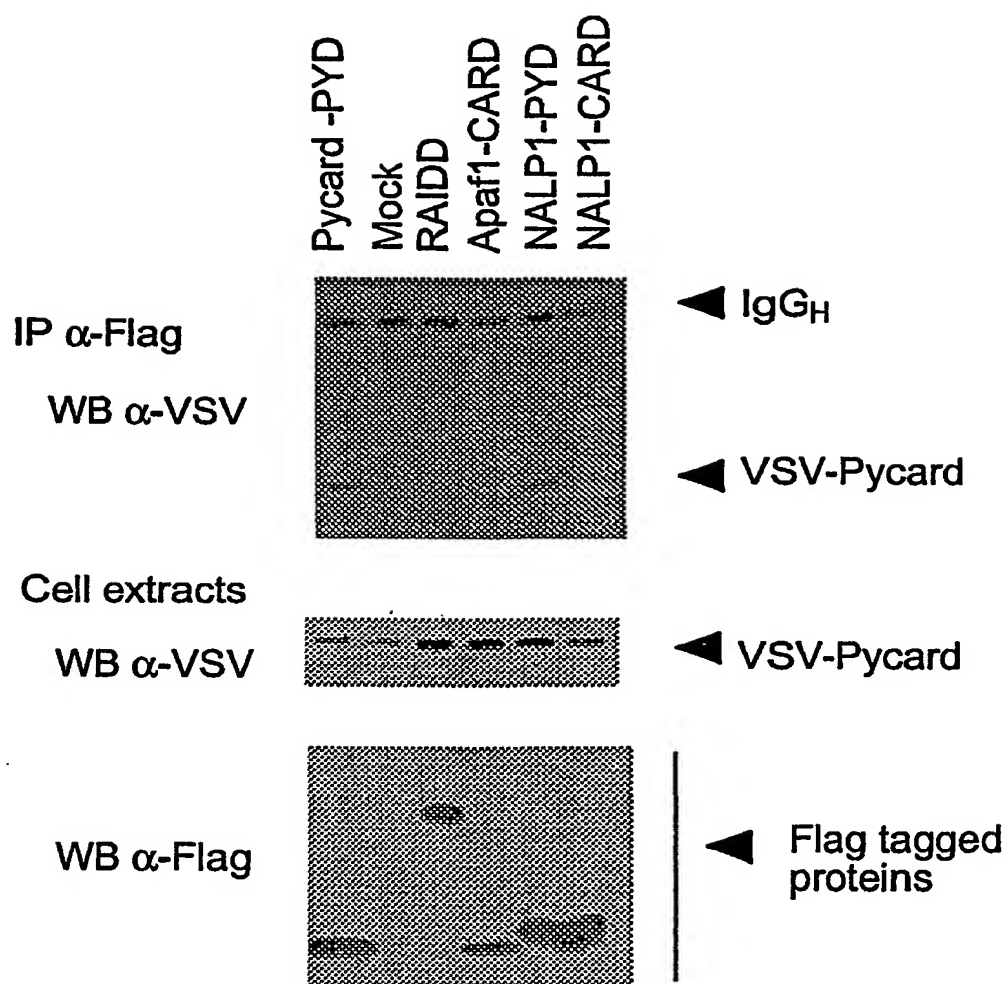
MA    /M: SY='F'; M=-16,-30,-21,-36,-26,47,-30,-20,8,-
30,26,8,-25,-30,-31,-20,-25,-11,3,4,17,-25;
MA    /M: SY='R'; M=-8,-2,-27,0,18,-26,-15,-2,-25,15,-19,-11,-
1,-11,18,22,-2,-8,-22,-24,-14,16;
MA    /M: SY='K'; M=-4,2,-24,1,2,-23,-13,-8,-16,8,-15,-4,0,-
14,4,4,-4,-5,-12,-25,-13,2;
MA    /M: SY='M'; M=-7,-22,-21,-31,-21,-1,-24,-10,24,-
16,19,43,-19,-20,-7,-16,-18,-7,14,-20,-1,-15;
MA    /M: SY='N'; M=-10,21,-25,11,-2,-24,9,5,-27,3,-29,-
18,34,-19,-2,5,3,-7,-28,-32,-18,-3;
MA    /M: SY='L'; M=-10,-18,-5,-21,-12,-8,-25,-12,-5,-6,6,3,-
15,-25,-5,5,-16,-10,-5,-22,-5,-10;
MA    /M: SY='R'; M=-11,2,-24,-1,3,-19,-18,-3,-17,10,-13,-
3,5,-15,8,15,-3,0,-15,-26,-11,4;
MA    /M: SY='D'; M=-5,12,-24,18,16,-26,-15,-2,-22,-1,-16,-
15,3,-11,4,-7,2,-4,-17,-31,-15,10;
MA    /M: SY='L'; M=-9,-28,-19,-29,-19,6,-29,-19,21,-
26,39,21,-28,-28,-18,-19,-25,-9,15,-22,-2,-19;
MA    /M: SY='C'; M=16,-15,25,-22,-17,-16,-13,-22,-15,-17,-
15,-12,-13,-21,-16,-21,3,-1,-4,-19,-18,-16;
MA    /M: SY='E'; M=-2,6,-25,10,25,-26,-10,-7,-25,7,-20,-
16,1,-8,6,1,0,-7,-20,-28,-18,15;
MA    /M: SY='R'; M=-13,-2,-29,-1,12,-27,-20,-1,-23,21,-19,-
6,-2,-13,20,28,-6,-9,-19,-23,-11,15;
MA    /M: SY='L'; M=13,-22,-16,-26,-18,-4,-16,-22,9,-21,19,6,-
21,-22,-17,-21,-12,-6,10,-21,-10,-18;
MA    /M: SY='Q'; M=-11,-4,-27,-4,5,-25,-18,2,-17,8,-14,-3,-
2,-15,21,14,-5,-7,-18,-23,-8,11;
MA    /M: SY='E'; M=-5,3,-27,6,17,-26,-8,-2,-29,11,-21,-15,1,-
11,6,13,-2,-9,-22,-25,-16,11;
MA    /M: SY='E'; M=-5,5,-27,6,22,-24,-13,-1,-20,2,-17,-13,4,-
9,6,1,-1,-8,-19,-28,-15,13;
MA    /M: SY='M'; M=-2,-17,-6,-25,-18,-9,-23,-16,6,-10,2,14,-
14,-20,-9,-7,-8,0,7,-25,-9,-15;
MA    /M: SY='N'; M=-3,1,-22,-4,1,-16,-15,-7,-10,3,-8,-3,5,-
17,-2,2,-5,-6,-9,-27,-13,0;
MA    /M: SY='H'; M=-6,1,-28,3,21,-26,-11,24,-28,2,-20,-11,2,-
11,15,4,-3,-12,-26,-26,-8,16;
MA    /M: SY='S'; M=-3,-1,-19,-4,-7,-18,-1,3,-17,-6,-21,-
12,9,-18,-5,-1,10,0,-9,-32,-14,-7;
MA    /M: SY='V'; M=-4,-21,-18,-23,-22,6,-2,-22,0,-22,1,-2,-
16,-25,-24,-19,-6,-5,9,-20,-8,-22;
MA    /I: E1=0; IE=-105; DE=-105;
CC    /GENERATED_BY="/usr/molbio/bin/pfmake -2b -
/usr/molbio/share/pftools/blosum45.cmp H=0.6";
//

```

Fig. 3/4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Fig. 4



Pycard HS 12:LETPAELKFKLKILSVPRREGYGRIPGALSLSDA DLTDKLV FYLETAEETANVLRDGLQEAQOMQAT:89  
 Pyrin HS 13:LEELVPYFEKFKFKLQNTS.OEHSRIPSOIQAPKATLIVYYGEEAVQLTLVLRNQRLAEELHRA:90  
 NALP1 HS 13:LEFKKLELFFQLLNKAHSRSSSGETPAQPEKTSG..TASLVQAQYGEQRAWDLALHTWEQGLRSLCAQAQA:90  
 NALP2 HS 13:LELSQDELSKFKYLTTFS.AELQIPKEKAD.GKQLVLT HCDSYVEMALVFEKLRMDLERAK:EV:90  
 Caspy DR 13:LSACADLRFQSLD...RQEPRRSTIKDEDLVDLLVNTTS.DAVSTDLRCNAAE LLNT:87  
 Pycard DR 13:FEDICADLKFKSKL D...RQEPRTSALKDEDLADLVGVTSKDAVSTELRCNAAE LLRNT:88  
 consensus 1:\*\*\*\*\*|\*-----\*\*\*\*\*-----\*\*\*\*\*:80

Diagram illustrating the domain organization of the proteins PYCARD, PYRIN, CASPY, NALP1, NALP2, and CARD4. The domains are represented by boxes: PYD (Pattern Recognition Domain), CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), B (B-box), SPRY (Spry domain), CASPASE (Caspase domain), NACHT (NACHT domain), and LRR (Leucine-Rich Repeat domain). The proteins are shown as linear sequences of these domains.

- PYCARD**: PYD — CARD
- PYRIN**: PYD — B — SPRY
- CASPY**: PYD — CASPASE
- NALP1**: PYD — NACHT — LRR
- NALP2**: PYD — NACHT — LRR
- CARD4**: CARD — NACHT — LRR

Fig. 5

MAGGAWGR LACV EPHKKBELKEFQMBLANKAHKSSSSGENTPAQPEKTSQNEVASVVAQNGEORANDLA  
 EPHKKBELKEFQMBLANKAHKSSSSGENTPAQPEKTSQNEVASVVAQNGEORANDLA  
 EPHKKBELKEFQMBLANKAHKSSSSGENTPAQPEKTSQNEVASVVAQNGEORANDLA  
 PDTSRRWRREISASLLYQALPSSPDHESPQESPNAPTSTAVLGSWGSPPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDE  
 TSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVGTPPQAHTISLQPHHPWEPVSRESLCSITWPKNEDFNQKFTQ  
 LLLLQRPHRSQDPLVKRWPDYVEENRGHLIEIRDI FGPGLDTQEPRIVILQGAAGIGKSTLARQVKEA  
 WGRGQLYGDRFQHVFFYFSCRELAQSKVVS LAELIGKDGATAPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQ  
 EPSSELCLHWSQPQADALLGSLGKTLILPEASFLITARTTALQNLIPSLAQARWVEVLGFSESSRKEYF  
 YRYFTDERQAIRAFRLVKS NKELWALCLVPVWSWLA CTCLMQMKRKEKLTLSKTTTTLCLHYLAQALQ  
 AQPLGPQLRDLCSLAAGIWKKTILFSPDDLKKGHLDGALISTFLKMGILQEHPIPLSYSFIHLCFQEFF  
 AAMSVVLEDEKGRGKHSNC IDLEKTL EAYGIHGLFGASTFRFLGLLSDEGEREMENIFHCRLSQGRNL  
 MQWVPSLQLLLQPHSLES LHC LYETR NKTFTLTQVMAHFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLQLLI  
 EGRQHRSTWSPMTMVVLFWRVVPVTDAYWQILFSLVKV IERNKELDESGNSLSHSAVRSKLTILRRPRCLLE  
 TLRAGCGELTAEDCKDLA FGLRANQTHTEEDLSFNVLTDAGAKHLCORLRQPSCKLQRLQVSCGLISDC  
 CQBLASVLSASPSIKHEIDLOQNNEDDVGVRLCEGIRHPACKLIRLGLDQTTLSDEMQRLELRALEQEKPO  
 LLI FSR RKP SVMTPEGLDTGEMSNSTSS LK RQRLG SERAASHVAQAN KIL DVSKIFFPIAEIAEESPE  
 VVPVELLCVPSPASQDGLHTKPLGTDDDFWGP TGVPVATEVVDKEKNLYRVHFPVAGSYRWPNTGLCFVMR  
 EAVTVEIEFCVWDQFLGEINPOHSMWVAGPLLDIKAEP GAVEAVHLPHFVALQCGHVDTSLFQMAHFKEE  
 GMLLEKPARVELHHIVLENPSFSP LGVLLKMIHNALRFPVTSVVLXYHRVHPEEVTFLXYLIPSDCSIR  
 KELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHLSGIRLQVKDKKDETLVWEALVKPGDLMPATTLIPPARIAVPSPLD  
 APQLHFEVDQYREQLIARVTSVEVVDKHHGQVLSQEQYERVLAENTRPSQMRKLFSLSQSMDRCKCKDGL  
 YQALKETHPHILIMEL EKGSKKGLLPLSS

Forts. Fig. 5

Protein	Residue	Sequence
PVD	Pyrcard	HS 12: L E N L P A F E E K K F K L K D L S . . . . . V P I R E . G Y G R I P . G A L E S M A . . . . . T D K F . S F L E T Y G A . L T . A . N I E R D . G L Q E M A G O T . Q A A T
	Pyzin	HS 13: L E E L P Y D F E K F K L Q N . . . . . T S I Q K . E H S R I P . S Q I Q A R P . K M . . . . . A T L L A T Y . G E E Y A V Q L T . L . Q U E R A . N Q R L A E E D H R A A
DED	Caspase8	HS 1: M D . . F S R N I Y D S E Q I D S . . . . . E D A S L K F F S I D Y P Q R Q P K D . . . . . A L M F F Q R L Q E K R M L E S N L . S F E K E F L F R I N R L D L I T Y
	FADD	HS 1: M D D P F L V L H S L S S S S . . . . . S E S T E L K F F C L G V G K R L P R Q S . . . . . G L D I F S M L L E Q N D L P G H T . E M R E P L A S L R R H D L R R
	PEA-15	HS 1: M V E . Y G T L F Q D I T N N L . . . . . E D E Q L K S A C K E D P S E S E T T . . . . . G S A W F S F L E S H N K L . K D N L . S M E H F E I S R P D L T M
CARD	APAF-1	HS 5: A R N C L Q H R E A E K D E K T S Y I M D H I S D G F T I S E E K V A N N P T Q Q . . . . . R A A M P K M I L K D . . . . . N D S Y V . S F Y N A L L H E G Y K . D E A L
	CED-3	CE 5: R R S L P E R N E M M F S H E K V D E I L E V I A K V E N S D N G M N S C G T V R E . . . . . K R R E L K A V Q R R G . . . . . V A F D . A F Y D A P R S T G H E . G P A E V
	CED-4	CE 6: E C R A S T A H T R I H D F E R P A L T Y E G K N I F T E D S E L S K M S T R L E . . . . . R I A N F R I E R R Q A S . . . . . L G . . . . . P M D F F N Y N N Q S . H E A D F
		HS 204: S D V D S K H I T T I A G V T L S . Q V K G F V R K N G V E A K T E E K N N N Q D T A . E Q K V Q L E R N H O L H G K K E A Y D . T E N K D I K K A N L C . T P A E K
DED	FAS	HS 93: G E E D C A A F N V C D N G K D . . . . . W R R P A Q L K S D T K D S E D R Y P R N L T . E R V R E S R I K N T E K E N A T V A . H N G A R S C Q M N . L M A D L
	RIP	HS 579: T T S L T D K H D P R E N I G K H . . . . . W K N C A R K L G T Q S Q E E D H Y E R D G L K E K V Y Q E Q K . V M R E G I K G A T V G K I A Q A P H Q C S R I D I F S S L

**Fig. 6**

Fig. 7

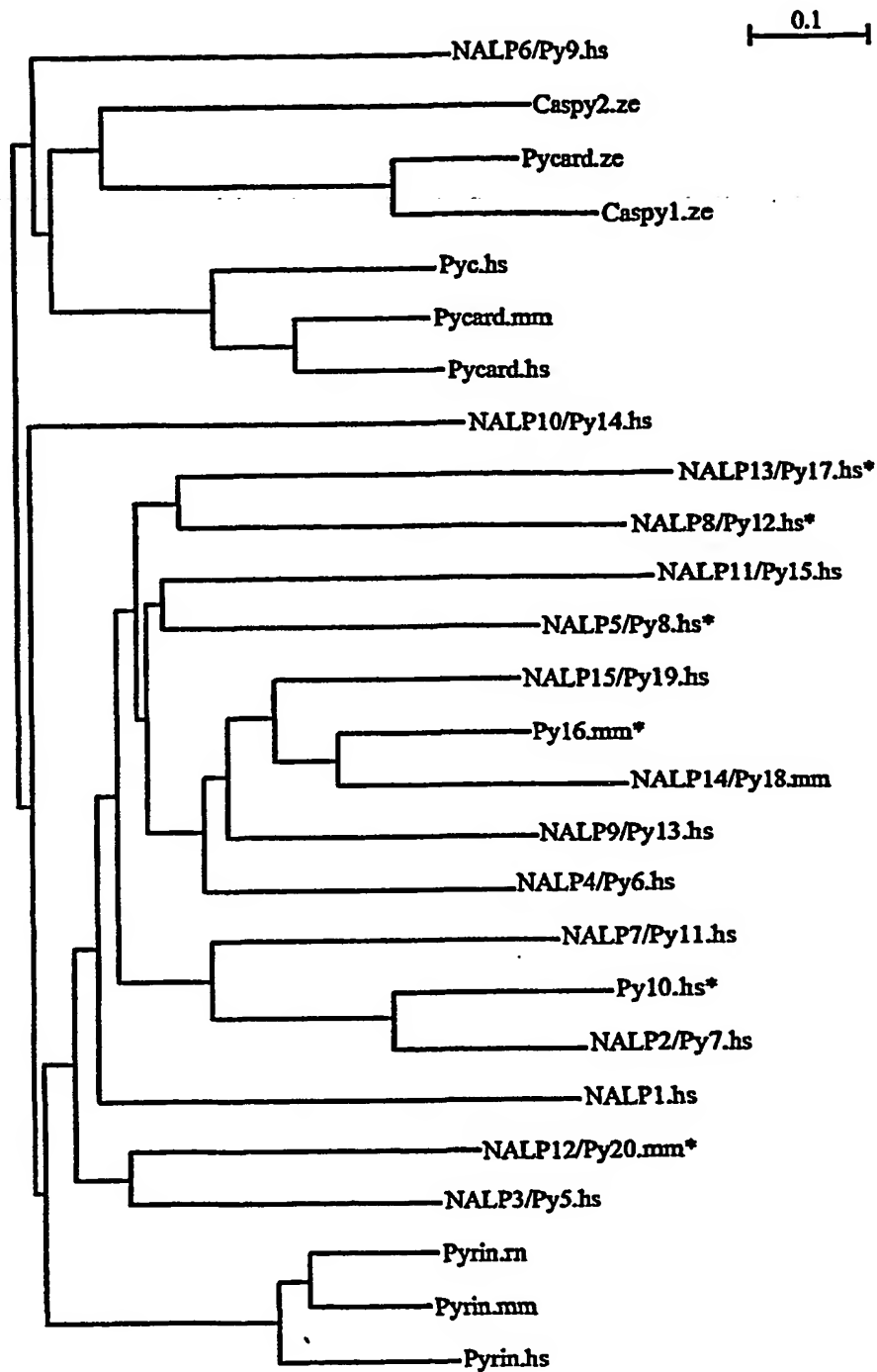


Fig. 8

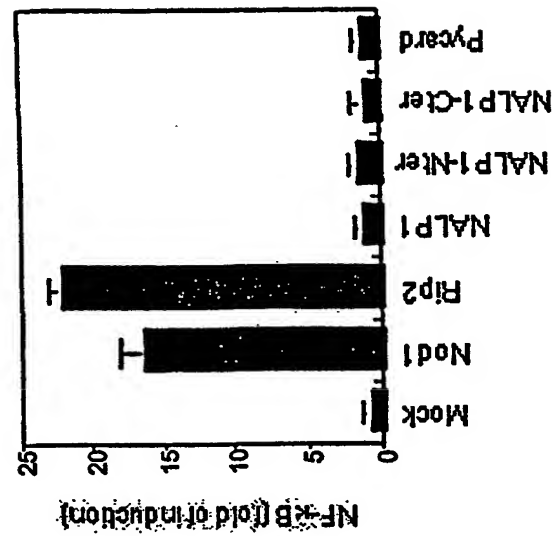
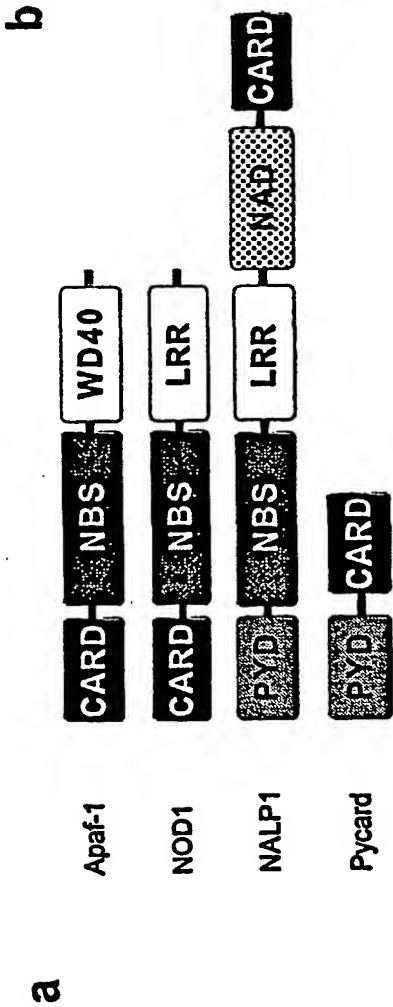
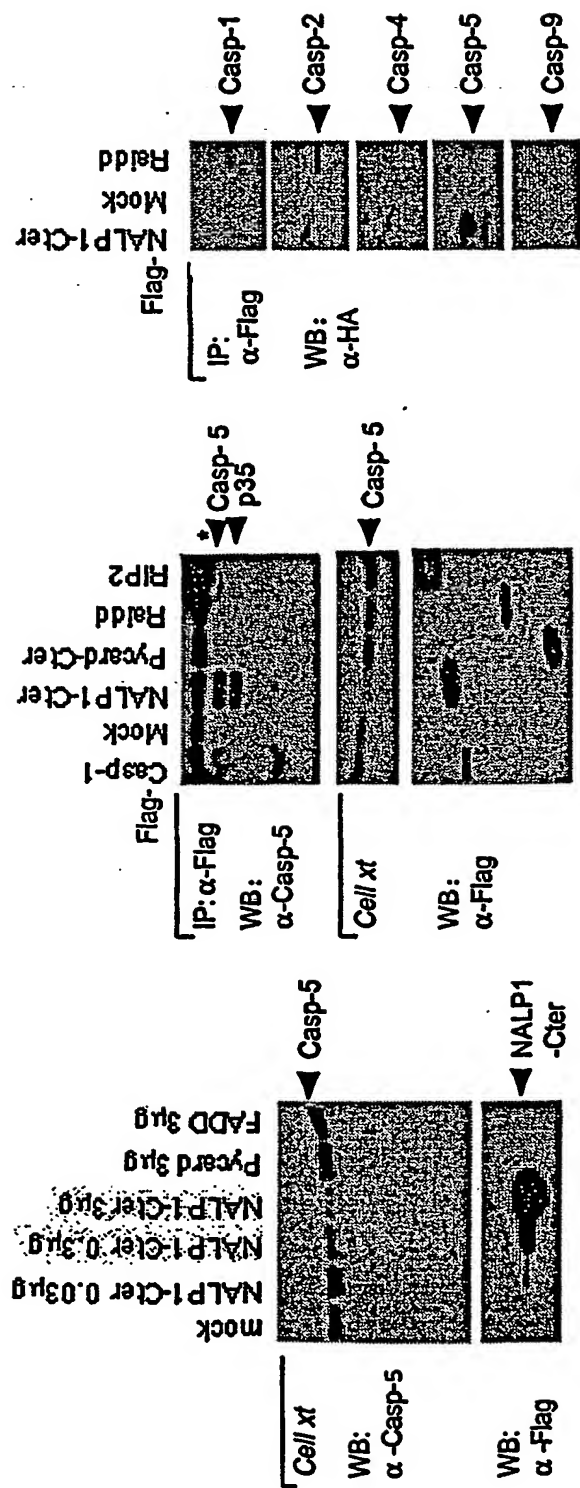


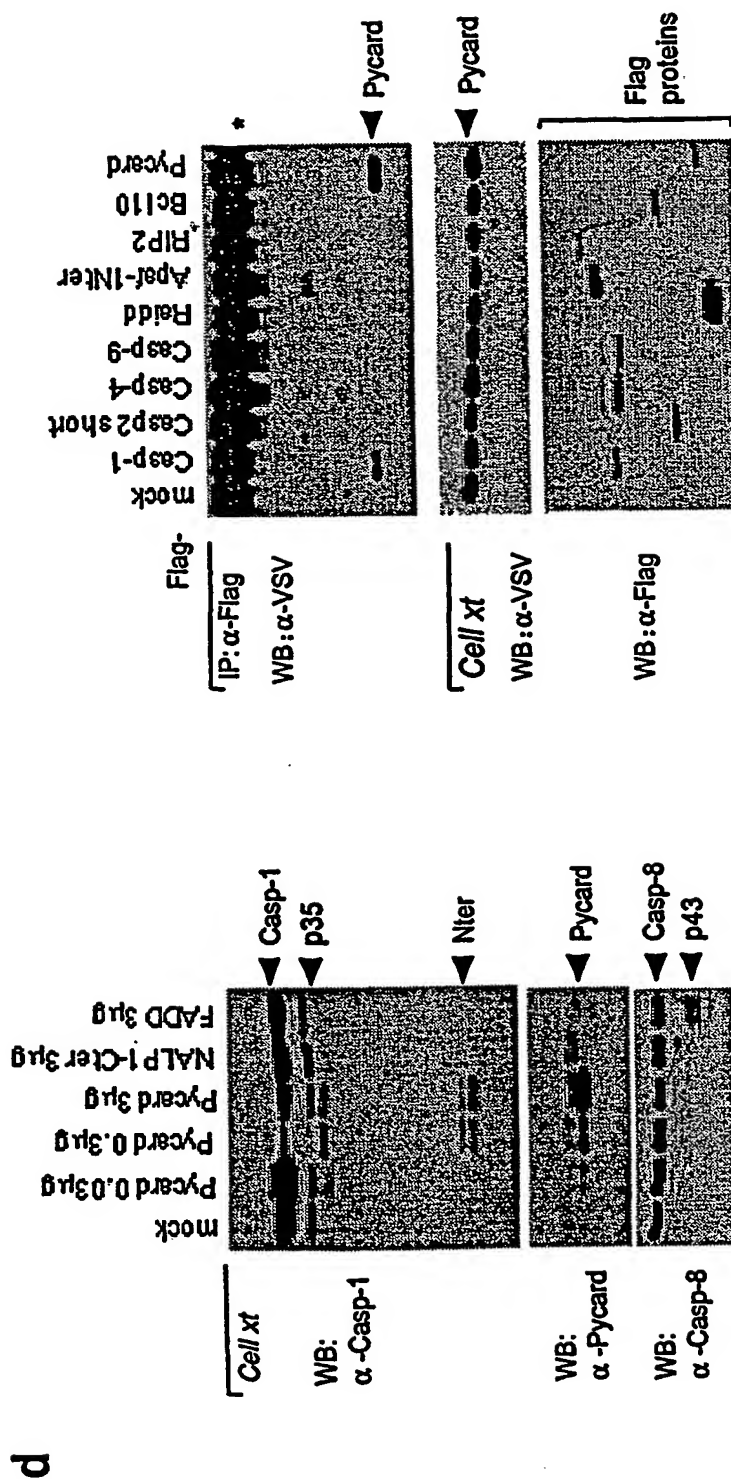
Fig. 9







Forts. Fig. 9



Forts. Fig. 9

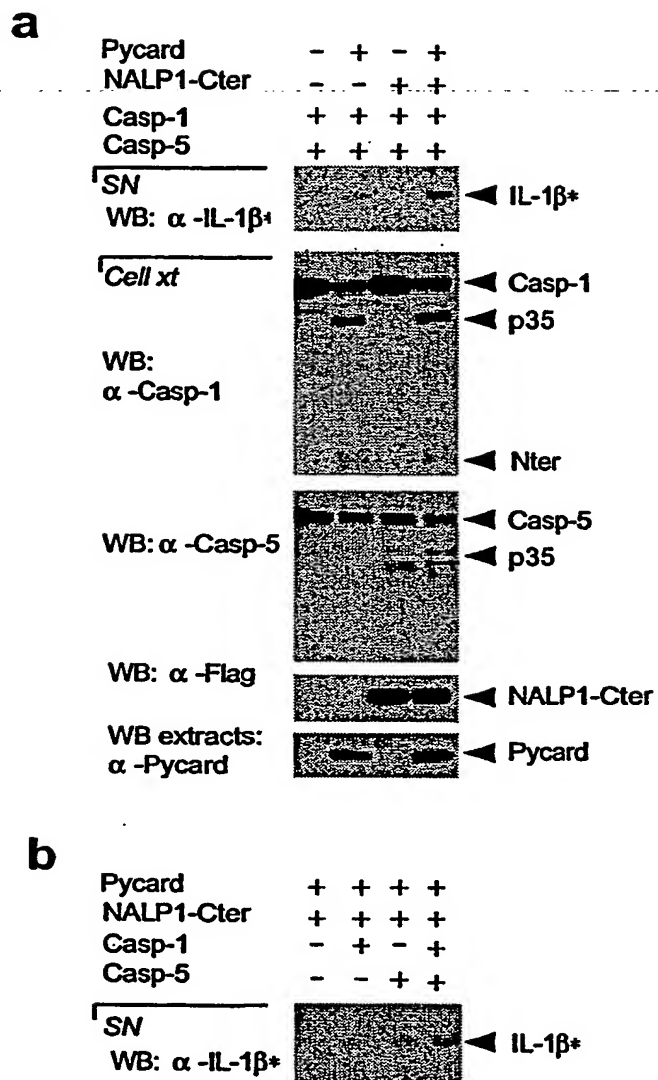


Fig. 10

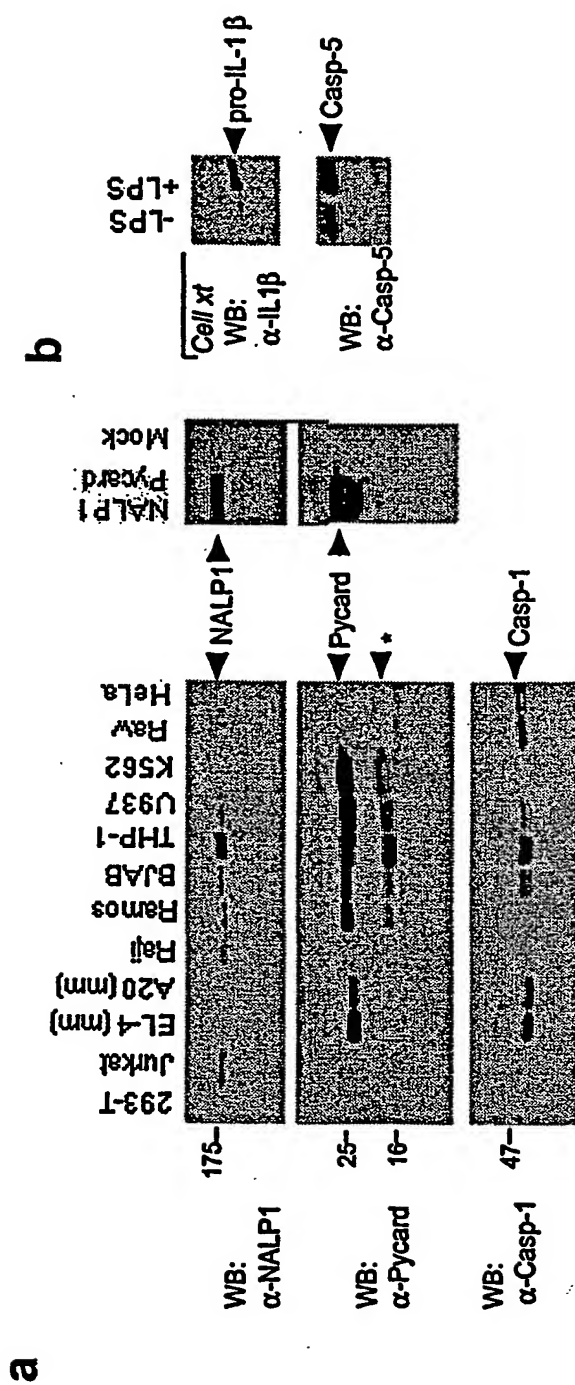
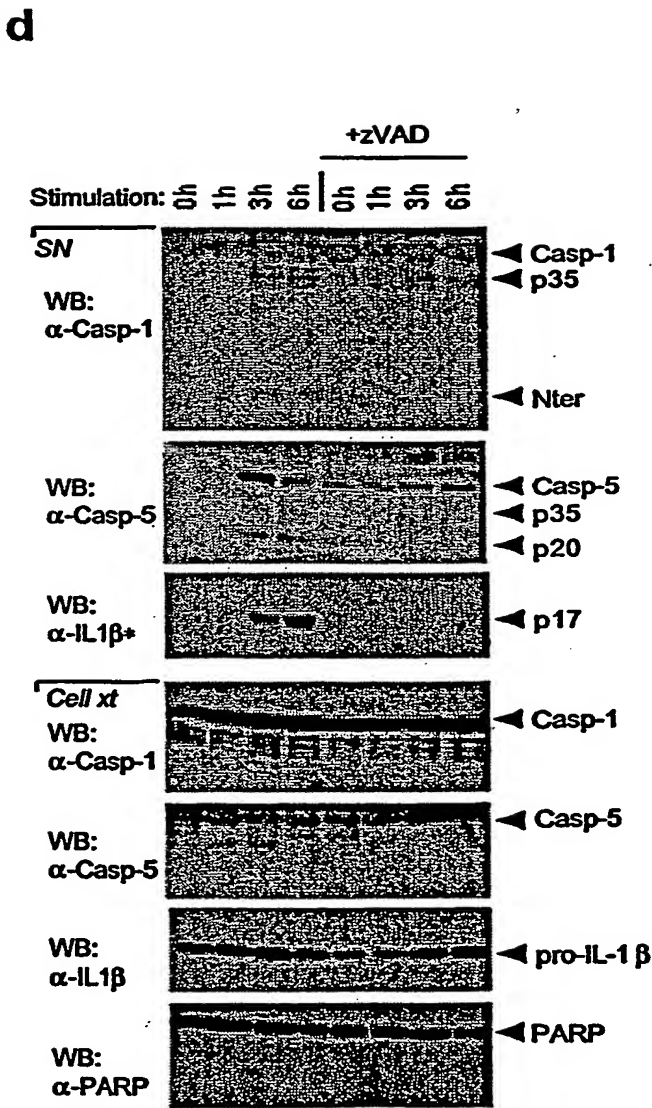
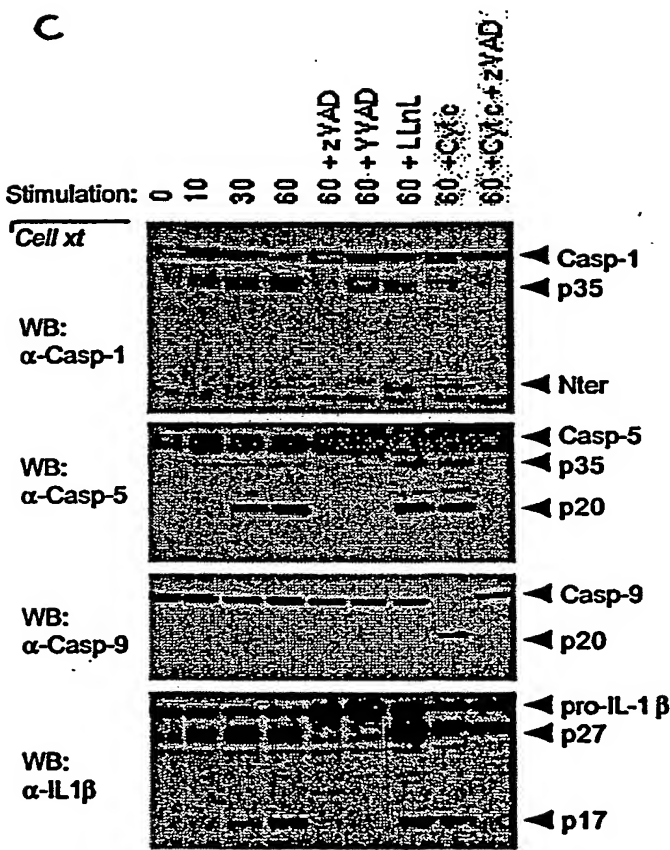


Fig. 11



Forts. Fig. 11

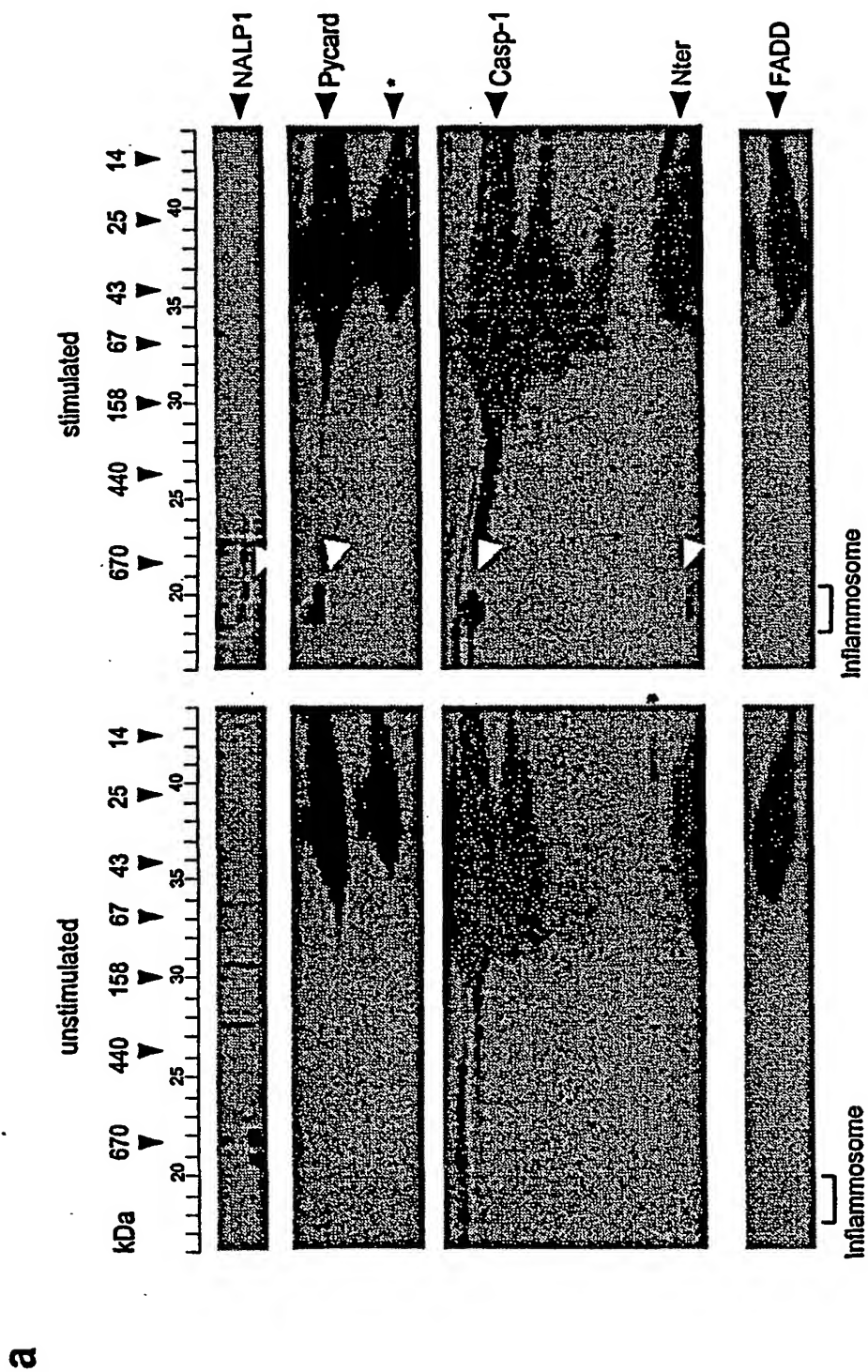
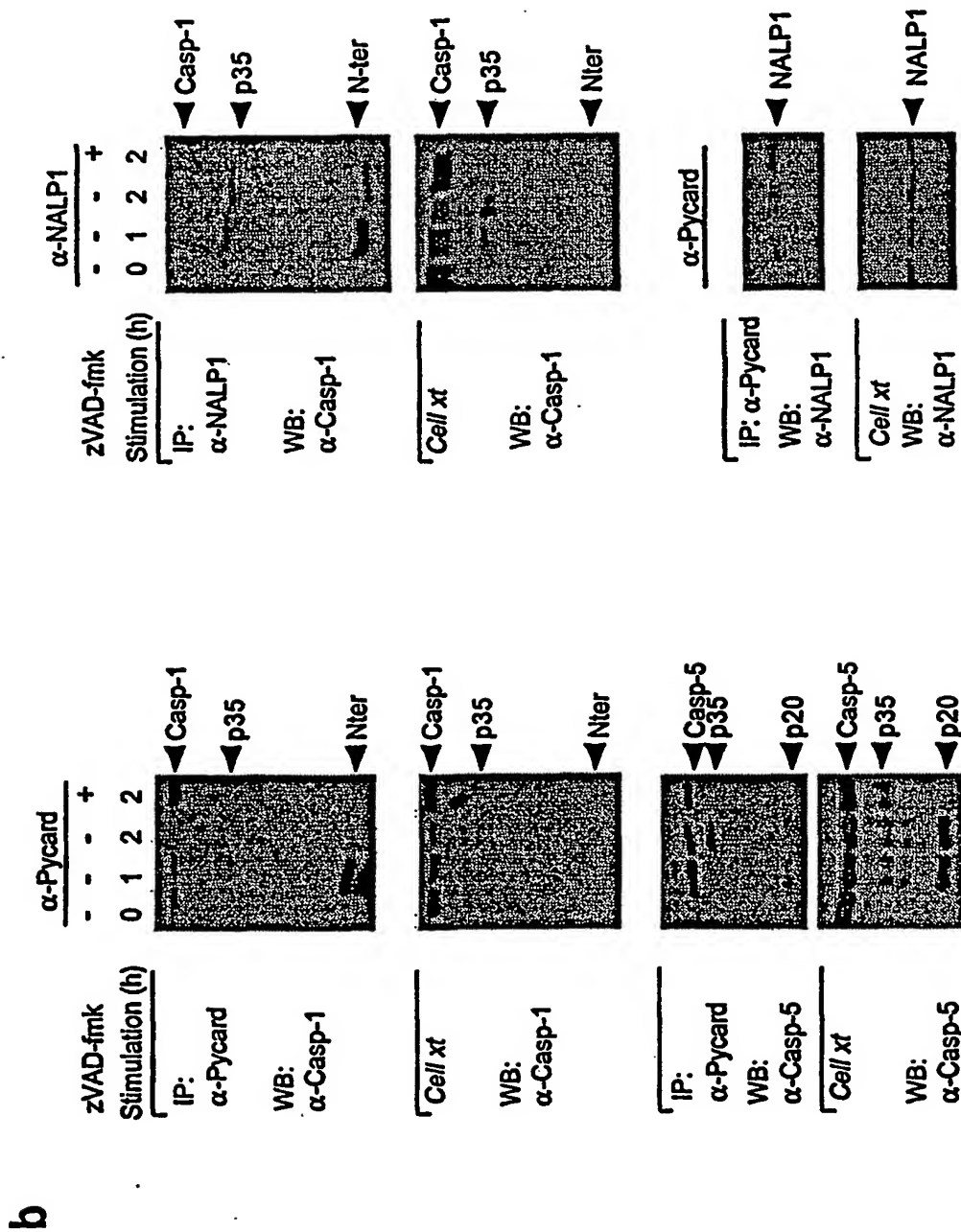


Fig. 12



Forts. Fig. 12

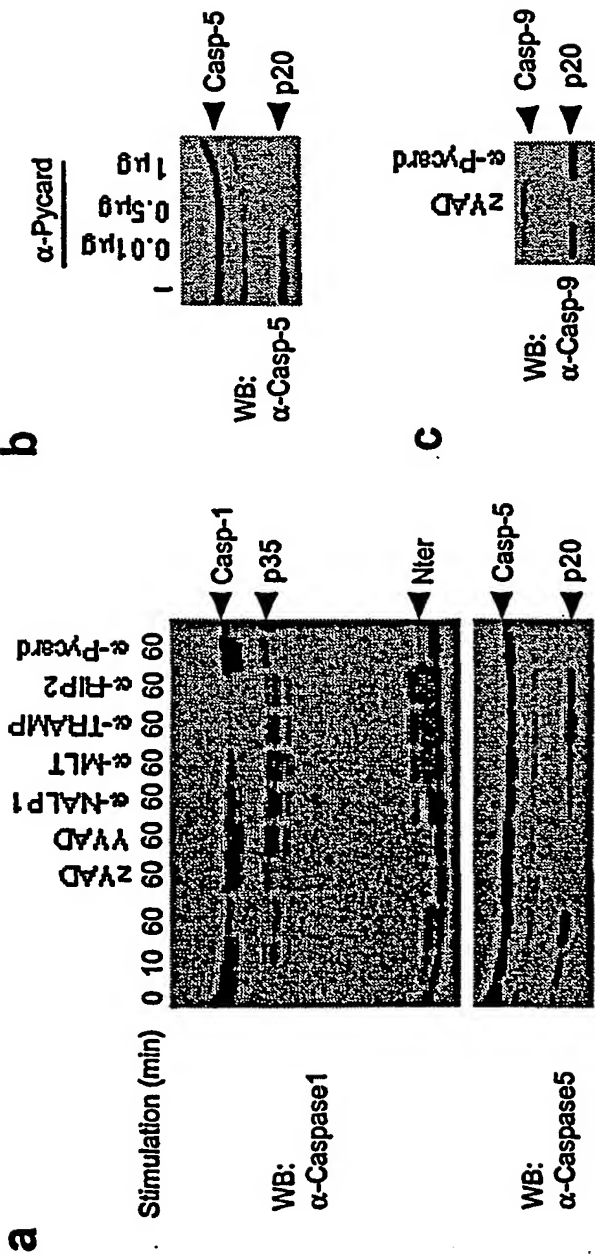
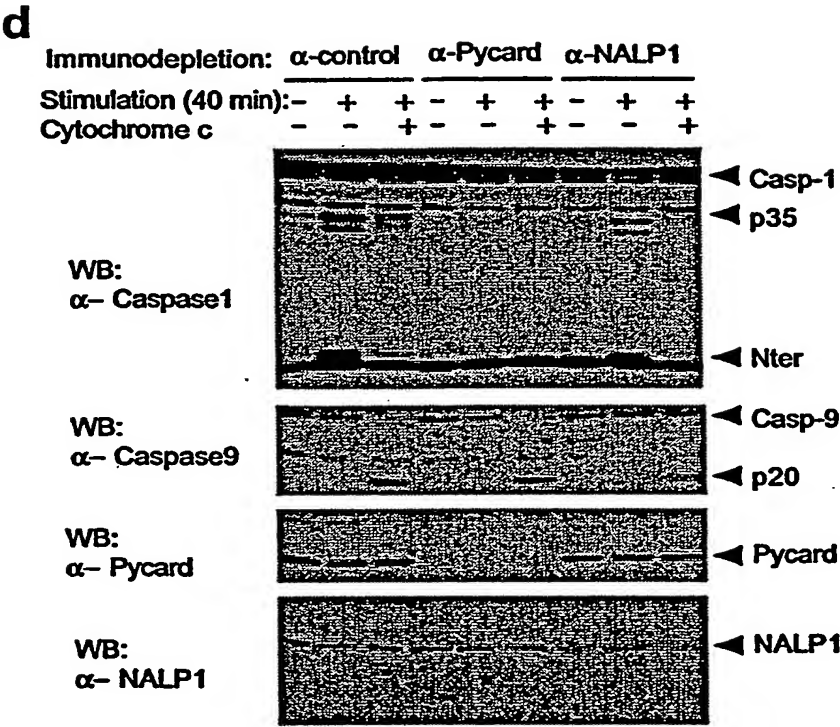


Fig.13



Forts. Fig. 13



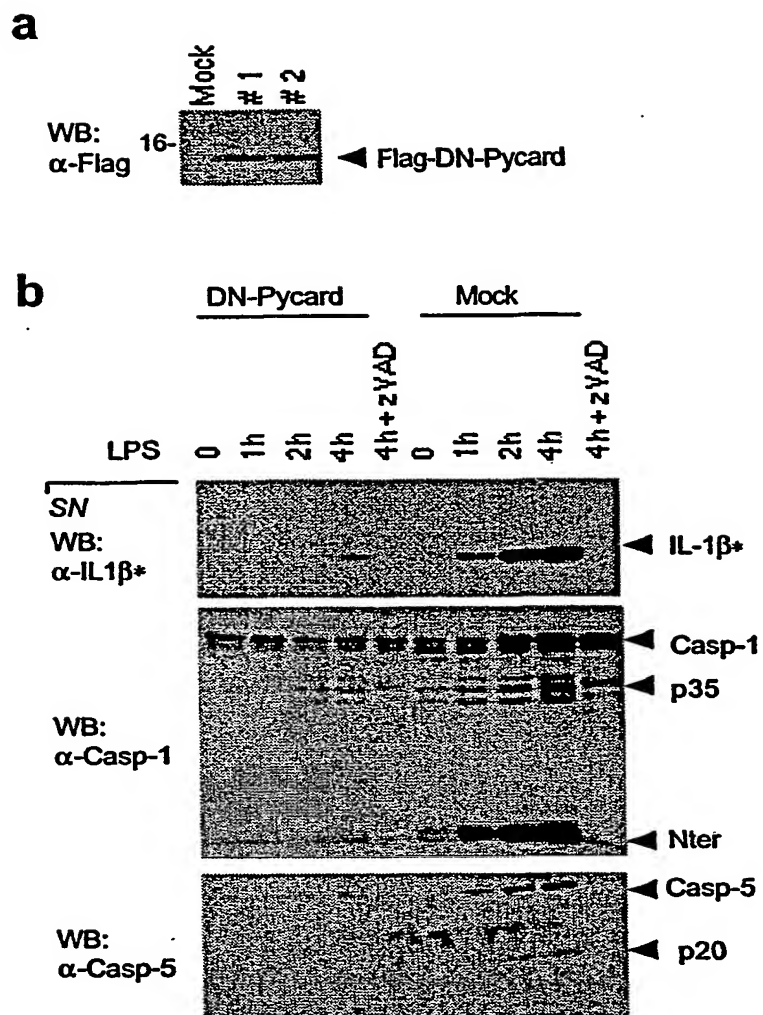


Fig. 14

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/040668 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/12,  
C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 38/17

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12545

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Oktober 2001 (30.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 56 687.1 15. November 2000 (15.11.2000) DE  
100 59 595.2 30. November 2000 (30.11.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): APOXIS SA [CH/CH]; 22, chemin des Croisettes,  
CH-1066 Epalinges (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TSCHOPP, Jürg  
[CH/CH]; 10, ch. des Fontannins, CH-1066 Epalinges  
(CH). MARTINON, Fabio [IT/IT]; Valentin 30, CH-1004  
Lausanne (CH).

(74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch,  
Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstrasse 8, 80333 München  
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

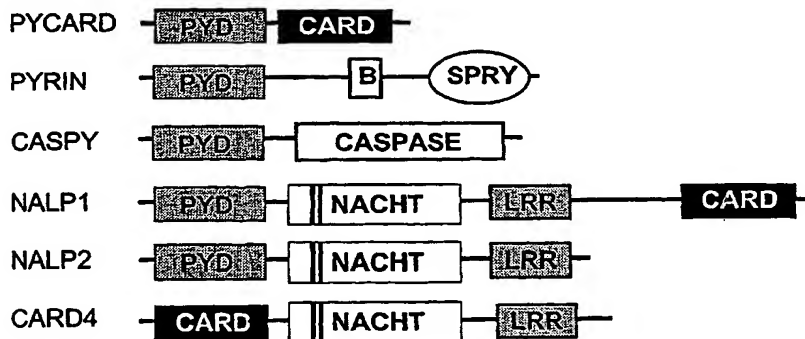
(54) Title: PROTEINS AND DNA SEQUENCES UNDERLYING THESE PROTEINS USED FOR TREATING INFLAMMA-  
TIONS

(54) Bezeichnung: PROTEINE UND DEN PROTEINEN ZUGRUNDELIEGENDE DNA-SEQUENZEN MIT FUNKTION BEI  
ENTZÜNDUNGSEREIGNISSEN

A

```
Pycard HS 12: LENTPARELEKFKKLTSLVPT...EGYGRIPGAILSD...AFDLQMLV...FVLET...AELTA...VLE...GLBE...AGOLQANT:89
Pyrin HS 13: LELVPPYPERKPKQNTSE...QREHSRIPSONCHAE...PEKATLLV...YNGE...AVOLT...VLE...NQRL...AE...LHRA:90
NALP1 HS 13: LELVPPYPERKPKQNTSE...QREHSRIPSONCHAE...PEKATLLV...YNGE...AVOLT...VLE...NQRL...AE...LHRA:90
NALP2 HS 13: LELVPPYPERKPKQNTSE...QREHSRIPSONCHAE...PEKATLLV...YNGE...AVOLT...VLE...NQRL...AE...LHRA:90
CaspY DR 13: LELVPPYPERKPKQNTSE...QREHSRIPSONCHAE...PEKATLLV...YNGE...AVOLT...VLE...NQRL...AE...LHRA:90
Pycard DR 13: LELVPPYPERKPKQNTSE...QREHSRIPSONCHAE...PEKATLLV...YNGE...AVOLT...VLE...NQRL...AE...LHRA:90
consensus 1:*****|*****:80
```

B



(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences, which code for at least one PYD domain, to expression vectors, which contain DNA sequences of this type, to host cells, which are transformed using expression vectors of this type, to purified gene products of said DNA sequences, to antibodies directed against said gene products, and to methods for isolating and/or expressing said gene products. The invention also relates to the use of said DNA sequences or of their gene products for treating inflammations.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/040668 A3



**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:**

3. Juli 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

---

**(57) Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren, die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind, aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen, Antikörper gegen für vorgenannten Genprodukte, sowie Verfahren zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten Genprodukte. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorgenannten DNA-Sequenzen oder von deren Genprodukten zur Behandlung von Entzündungsereignissen.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/12545

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A61K48/00 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MASUMOTO J ET AL: "ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 274, no. 48, 26 November 1999 (1999-11-26), pages 33835-33838, XP002191744 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-19
Y	& DATABASE EMBL [Online] 1 December 1999 (1999-12-01) retrieved from EBI Database accession no. AB023416 abstract --- -/--	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 2002

Date of mailing of the international search report

16. 01. 03

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rutz, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 01/12545

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE EMBL [Online] 3 September 1998 (1998-09-03) retrieved from EBI Database accession no. AF086332 XP002213126 abstract ---	1-19
A	INOHARA N ET AL: "Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish." CELL DEATH AND DIFFERENTIATION. ENGLAND MAY 2000, vol. 7, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 509-510, XP002213121 ISSN: 1350-9047 the whole document ---	1-19
A	DATABASE EPOP [Online] 5 September 2000 (2000-09-05) retrieved from EBI Database accession no. AX017324 XP002213127 abstract & WO 99 47669 A (SCHMITT ARMIN ET AL.) 23 September 1999 (1999-09-23) ---	1-19
A	HOFMANN K: "The modular nature of apoptotic signaling proteins" CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH, vol. 55, July 1999 (1999-07), pages 1113-1128, XP002171651 ISSN: 1420-682X the whole document ---	1-19
P,X	DATABASE GSP [Online] 9 March 2001 (2001-03-09) retrieved from EBI Database accession no. AAB36608 XP002213128 abstract & WO 00 70047 A (INCYTE GENOMICS INC.) 23 November 2000 (2000-11-23) ---	1-19
E	PAWLOWSKI K ET AL: "PAAD - a new protein domain associated with apoptosis, cancer and autoimmune diseases." TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ENGLAND FEB 2001, vol. 26, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 85-87, XP002213122 ISSN: 0968-0004 the whole document figure 1 ---	1-19
P,X	PAWLOWSKI K ET AL: "PAAD - a new protein domain associated with apoptosis, cancer and autoimmune diseases." TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ENGLAND FEB 2001, vol. 26, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 85-87, XP002213122 ISSN: 0968-0004 the whole document figure 1 ---	1-19

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/12545

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	MASUMOTO J ET AL: "Pyrin N-terminal homology domain- and caspase recruitment domain-dependent oligomerization of ASC." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. UNITED STATES 26 JAN 2001, vol. 280, no. 3, 26 January 2001 (2001-01-26), pages 652-655, XP002213123 ISSN: 0006-291X the whole document ---	1-19
P,A	BERTIN J ET AL: "THE PYRIN DOMAIN: A NOVEL MOTIF FOUND IN APOPTOSIS AND INFLAMMATION PROTEINS" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, EDWARD ARNOLD, OXFORD, GB, vol. 12, no. 7, December 2000 (2000-12), pages 1273-1274, XP008006072 ISSN: 1350-9047 the whole document ---	1-19
P,A	FAIRBROTHER W J ET AL: "THE PYRIN DOMAIN: A MEMBER OF THE DEATH DOMAIN-FOLD SUPERFAMILY" PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 9, no. 10, September 2001 (2001-09), pages 1911-1918, XP008006069 ISSN: 0961-8368 the whole document ---	1-19
P,A	STAUB E ET AL: "The DAPIN family: a novel domain links apoptotic and interferon response proteins." TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ENGLAND FEB 2001, vol. 26, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 83-85, XP002213124 ISSN: 0968-0004 the whole document ---	1-19
P,A	MARTINON F ET AL: "The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation." CURRENT BIOLOGY: CB. ENGLAND 20 FEB 2001, vol. 11, no. 4, 20 February 2001 (2001-02-20), pages R118-R120, XP002213125 ISSN: 0960-9822 the whole document -----	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/12545

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims 17-19 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

2. ☒ Claims Nos.: 20-23  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See additional sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

X

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-19 (partly)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



Continuation of I.2

Claims: 20-23

Claims 20-23 are directed to compounds that block the specific interaction of PYD domains for intracellular signal transduction, and to medical use thereof. A search appears possible for want of any indication of sufficient structural features of such a compound.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## 1. Claims: Invention 1: Claims 1-19 (in part)

DNA sequence coding for human PYC protein (SEQ ID NO: 2), expression vectors, host cells, gene product (SEQ ID NO: 1), antibodies, method of isolating the gene product, method of expressing the gene product, medical use of the DNA sequence or of the gene product.

## 2. Claims: Invention 2: Claims 1-19 (in part)

DNA sequence coding for human pyrin protein (SEQ ID NO: 4), expression vectors, host cells, gene product (SEQ ID NO: 3), antibodies, method of isolating the gene product, method of expressing the gene product, medical use of the DNA sequence or of the gene product.

## 3. Claims: Invention 3: Claims 1-19 (in part)

DNA sequence coding for human PYCARD protein (SEQ ID NO: 6), expression vectors, host cells, gene product (SEQ ID NO: 5), antibodies, method of isolating the gene product, method of expressing the gene product, medical use of the DNA sequence or of the gene product.

## 4. Claims: Inventions 4-20: Claims 1-19 (in part)

analogously for DNA sequences with SEQ ID NO: 8, 10, 12, ..., 38, 40.

## 5. Claims: Invention 21: Claims 11-14 and 17-19 (in part)

gene product containing an amino acid sequence for a PYD domain from the mouse pyrin protein (SEQ ID NO: 60, pycard.mm), antibodies, medical use of the gene product.

## 6. Claims: Invention 21: Claims 11-14 and 17-19 (in part)

gene product containing an amino acid sequence for a PYD domain from the mouse pyrin protein (SEQ ID NO: 60, pycard.mm), antibodies, medical use of the gene product.

## 7. Claims: Inventions 23-26: Claims 11-14 and 17-19 (in part)

analogously for gene products with SEQ ID NO: 63, 82, 83, 84.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/12545

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9947669 A	23-09-1999	DE 19813839 A	23-09-1999
		EP 1236799 A	04-09-2002
		EP 1064379 A	03-01-2001
		JP 2002506643 T	05-03-2002
-----			
WO 0070047 A	23-11-2000	AU 5134600 A	05-12-2000
		EP 1179065 A	13-02-2002
		US 2002076762 A	20-06-2002
-----			

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/12545

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A61K48/00 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MASUMOTO J ET AL: "ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 274, Nr. 48, 26. November 1999 (1999-11-26), Seiten 33835-33838, XP002191744 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1-19
Y	& DATABASE EMBL 'Online! 1. Dezember 1999 (1999-12-01) retrieved from EBI Database accession no. AB023416 Zusammenfassung --- -/--	1-19



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. September 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16. 01. 03

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rutz, B

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>DATABASE EMBL 'Online!  3. September 1998 (1998-09-03)  retrieved from EBI  Database accession no. AF086332  XP002213126  Zusammenfassung</p>	1-19
A	<p>---  INOHARA N ET AL: "Genes with homology to  mammalian apoptosis regulators identified  in zebrafish."  CELL DEATH AND DIFFERENTIATION. ENGLAND  MAY 2000,  Bd. 7, Nr. 5, Mai 2000 (2000-05), Seiten  509-510, XP002213121  ISSN: 1350-9047  das ganze Dokument</p>	1-19
A	<p>---  DATABASE EPOP 'Online!  5. September 2000 (2000-09-05)  retrieved from EBI  Database accession no. AX017324  XP002213127  Zusammenfassung  &amp; WO 99 47669 A (SCHMITT ARMIN ET AL.)  23. September 1999 (1999-09-23)</p>	1-19
A	<p>---  HOFMANN K: "The modular nature of  apoptotic signaling proteins"  CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES,  BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH,  Bd. 55, Juli 1999 (1999-07), Seiten  1113-1128, XP002171651  ISSN: 1420-682X  das ganze Dokument</p>	1-19
P,X	<p>---  DATABASE GSP 'Online!  9. März 2001 (2001-03-09)  retrieved from EBI  Database accession no. AAB36608  XP002213128  Zusammenfassung</p>	1-19
E	<p>&amp; WO 00 70047 A (INCYTE GENOMICS INC.)  23. November 2000 (2000-11-23)</p>	1-19
P,X	<p>---  PAWLOWSKI K ET AL: "PAAD - a new protein  domain associated with apoptosis, cancer  and autoimmune diseases."  TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ENGLAND  FEB 2001,  Bd. 26, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02),  Seiten 85-87, XP002213122  ISSN: 0968-0004  das ganze Dokument  Abbildung 1</p>	1-19
	<p>---  -/--</p>	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	MASUMOTO J ET AL: "Pyrin N-terminal homology domain- and caspase recruitment domain-dependent oligomerization of ASC." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. UNITED STATES 26 JAN 2001, Bd. 280, Nr. 3, 26. Januar 2001 (2001-01-26), Seiten 652-655, XP002213123 ISSN: 0006-291X das ganze Dokument	1-19
P,A	BERTIN J ET AL: "THE PYRIN DOMAIN: A NOVEL MOTIF FOUND IN APOPTOSIS AND INFLAMMATION PROTEINS" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, EDWARD ARNOLD, OXFORD, GB, Bd. 12, Nr. 7, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 1273-1274, XP008006072 ISSN: 1350-9047 das ganze Dokument	1-19
P,A	FAIRBROTHER W J ET AL: "THE PYRIN DOMAIN: A MEMBER OF THE DEATH DOMAIN-FOLD SUPERFAMILY" PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 9, Nr. 10, September 2001 (2001-09), Seiten 1911-1918, XP008006069 ISSN: 0961-8368 das ganze Dokument	1-19
P,A	STAUB E ET AL: "The DAPIN family: a novel domain links apoptotic and interferon response proteins." TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES. ENGLAND FEB 2001, Bd. 26, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02), Seiten 83-85, XP002213124 ISSN: 0968-0004 das ganze Dokument	1-19
P,A	MARTINON F ET AL: "The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation." CURRENT BIOLOGY: CB. ENGLAND 20 FEB 2001, Bd. 11, Nr. 4, 20. Februar 2001 (2001-02-20), Seiten R118-R120, XP002213125 ISSN: 0960-9822 das ganze Dokument	1-19

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
 Obwohl die Ansprüche 17-19 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. 20-23  
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
 siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
 Ansprüche 1-19 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 20-23

Ansprüche 20-23 sind auf Verbindungen gerichtet, die die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung blockieren bzw. auf deren medizinische Verwendung. Da keine ausreichenden strukturellen Merkmale solcher Verbindung angegeben wurden, erscheint eine Recherche nicht möglich.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 1. Ansprüche: Erfindung 1: Ansprüche 1-19 (teilweise)

DNA-Sequenz kodierend für menschliches Pyc Protein (SEQ ID NO: 2), Expressionsvektoren, Wirtszellen, Genprodukt (SEQ ID NO: 1), Antikörper, Verfahren zur Isolierung des Genprodukts, Verfahren zur Expression des Genprodukts, medizinische Verwendung der DNA-Sequenz oder des Genprodukts

## 2. Ansprüche: Erfindung 2: Ansprüche 1-19 (teilweise)

DNA-Sequenz kodierend für menschliches Pyrin Protein (SEQ ID NO: 4), Expressionsvektoren, Wirtszellen, Genprodukt (SEQ ID NO: 3), Antikörper, Verfahren zur Isolierung des Genprodukts, Verfahren zur Expression des Genprodukts, medizinische Verwendung der DNA-Sequenz oder des Genprodukts

## 3. Ansprüche: Erfindung 3: Ansprüche 1-19 (teilweise)

DNA-Sequenz kodierend für menschliches Pycard Protein (SEQ ID NO: 6), Expressionsvektoren, Wirtszellen, Genprodukt (SEQ ID NO: 5), Antikörper, Verfahren zur Isolierung des Genprodukts, Verfahren zur Expression des Genprodukts, medizinische Verwendung der DNA-Sequenz oder des Genprodukts

## 4. Ansprüche: Erfindungen 4-20: Ansprüche 1-19 (teilweise)

analog für DNA-Sequenzen mit SEQ ID NO: 8, 10, 12, ... , 38, 40

## 5. Ansprüche: Erfindung 21: Ansprüche 11-14, 17-19 (teilweise)

Genprodukt enthaltend eine Aminosäuresequenz für eine PYD-Domäne aus dem Pyrin-Protein der Maus (SEQ ID NO: 60, Pycard.mm), Antikörper, medizinische Verwendung des Genprodukts

## 6. Ansprüche: Erfindung 22: Ansprüche 11-14, 17-19 (teilweise)

Genprodukt enthaltend eine Aminosäuresequenz für eine PYD-Domäne aus dem Pyrin-Protein der Ratte (SEQ ID NO: 61, Pycard.mm), Antikörper, medizinische Verwendung des Genprodukts

## 7. Ansprüche: Erfindungen 23-26: Ansprüche 11-14, 17-19 (teilweise)

analog für Genprodukte mit SEQ ID NO: 63, 82, 83, 84

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/12545

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9947669 A	23-09-1999	DE 19813839 A	23-09-1999
		EP 1236799 A	04-09-2002
		EP 1064379 A	03-01-2001
		JP 2002506643 T	05-03-2002
WO 0070047 A	23-11-2000	AU 5134600 A	05-12-2000
		EP 1179065 A	13-02-2002
		US 2002076762 A	20-06-2002